

534, 082

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月21日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/041850 A1(51) 国際特許分類:
A61K 38/10, C07K 16/18, A61K 39/395

C07K 7/08,

県牛久市中央1丁目4-23 Ibaraki (JP). 吉田 博美 (YOSHIDA, Hiromi) [JP/JP]; 〒300-2741 茨城県結城郡石下町大字国生1444-23 Ibaraki (JP). 西一紀 (NISHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16-1-402 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014138

(22) 国際出願日: 2003年11月6日 (06.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-324189 2002年11月7日 (07.11.2002) JP
特願2002-367119
2002年12月18日 (18.12.2002) JP
特願2003-59073 2003年3月5日 (05.03.2003) JP
特願2003-191359 2003年7月3日 (03.07.2003) JP

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7-9-1402 Ibaraki (JP). 小林 真 (KOBAYASHI, Makoto) [JP/JP]; 〒651-2276 兵庫県神戸市西区春日台七丁目5-5 Hyogo (JP). 羽畑 祐吾 (HABATA, Yugo) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17-1-606 Ibaraki (JP). 原田 征隆 (HARADA, Masataka) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東2丁目14-5-201 Ibaraki (JP). 大久保 尚一 (OKUBO, Shoichi) [JP/JP]; 〒300-1234 茨城

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL FPRL1 LIGANDS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規なFPRL1リガンドおよびその用途

(57) Abstract: By using an FPRL1 ligand having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:21 together with FPRL1, an FPRL1 agonist or an FPRL1 antagonist can be efficiently screened.

(57) 要約: 配列番号: 1、配列番号: 17または配列番号: 21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するFPRL1リガンドとFPRL1を用いることにより、FPRL1アゴニストまたはFPRL1アンタゴニストを効率良くスクリーニングすることができる。

WO 2004/041850 A1

明 細 書

新規なF P R L 1 リガンドおよびその用途

5 技術分野

本発明は、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質であるF P R L 1 に対する新規な内因性リガンドおよびその用途に関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G 蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7 個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていること
- 15 から、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7 回膜貫通型レセプター蛋白質 (7 TMR) と総称される。

- G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レ
- 20 セプター蛋白質は生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG 蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。
- 25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内に

は未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

- 5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

- 10 近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質の1つとして、ヒトFPRL1 (J. Biol. Chem. 267(11), 7637-7643(1992))、マウスFPRL2 (J. Immunol. 169, 3363-3369 (2002)) などのFPRL1が知られている。

- 20 FPRL1のアゴニストとしては、これまでにバクテリア由来のfMLP、HIV由来のgp41あるいはgp120の部分ペプチド、プリオンの部分ペプチド、内因性の物質としてはA β 42、Annexin Iの部分ペプチド、Acute phase protein、hCAP18、NADH dehydrogenaseなどの部分ペプチド、脂質であるリポキシンA4などが報告されている (Int. Immunopharmacol. 2巻、1-13頁、2002年)。

- 25 また、FPRL1 (リポキシンA₄レセプター蛋白質) が抗炎症作用に寄与していることが報告されている (Nature Medicine, 2002 Nov; 8(11): 1296-1302)。

A β 42が単球やミクログリアのFPRL1に結合して取り込まれ、繊維化することが報告されている (Journal of Leukocyte Biology, Vol. 72, 628, (2002))

) 。

ミトコンドリア蛋白質のN末端が多形核白血球の遊走因子であり、損傷を受けた細胞からのミトコンドリア蛋白質の放出が炎症を引き起こすことが報告されている (Biochem Biophys Res Commun. 1995 Jun 26;211(3):812-818) 。

- 5 N末端がホルミル化されたミトコンドリア蛋白質 (NADH d e h y d r o g e n a s e) が好中球の遊走因子であることが報告されている (J Exp Med., 1982 Jan 1; 155(1): 264-275) 。

- 10 本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であるF P R L 1に対する内因性の新規なリガンド、該リガンドとF P R L 1との結合性を変化させる化合物またはその塩 (アンタゴニスト、アゴニスト) のスクリーニング方法などを提供することを目的とする。

発明の開示

- 15 本発明者らは、上記の課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、ブタ胃抽出液からF P R L 1に結合する新規な内因性リガンドを単離精製することに成功した。さらに、本発明者らは、ラット由来の新規なF P R L 1をコードするDNAをクローニングすることに成功した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- 20 (1) N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：1または配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- 25 (2) N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなる上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (3) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：1または配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなる上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(4) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：21または配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

5 (5) N末端のメチオニン残基がホルミル化され、C末端のイソロイシン残基が修飾されている配列番号：21または配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

10 (6) N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：17または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(7) N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなる上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
15 (8) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19または配列番号：20で表されるアミノ酸配列からなる上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

20 (9) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：23または配列番号：24で表されるアミノ酸配列からなる上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(10) 上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

25 (11) 上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、

(12) 細胞遊走刺激剤である上記(10)または(11)記載の医薬、

(13) 抗炎症剤である上記(10)または(11)記載の医薬、

(14) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、

- 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である上記（10）または（11）記載の医薬、
- 5 (15) 上記（1）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- 10 (16) 上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- (17) 上記（15）記載の抗体を含有してなる診断剤、
- (18) 上記（16）記載の抗体を含有してなる診断剤、
- 15 (19) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である上記（17）または（18）記載の診断剤、
- 20 (20) 上記（15）記載の抗体を含有してなる医薬、
- 25 (21) 上記（16）記載の抗体を含有してなる医薬、
- (22) 細胞遊走抑制剤である上記（20）または（21）記載の医薬、
- (23) 感染症の予防・治療剤である上記（20）または（21）記載の医薬、
- (24) (1). 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的

に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2)①上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(25) (1) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2)①上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(26) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質が、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質である上記(24)または(25)記載のスクリーニング方法、

(27) (1) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2)①上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくは

はそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (28) (1) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) ①上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (29) 上記(24)もしくは(25)記載のスクリーニング方法または上記(27)もしくは(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)または(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩、

- (30) アゴニストである上記(29)記載の化合物、
(31) アンタゴニストである上記(29)記載の化合物、
(32) 上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (33) 上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (34) 上記(30)記載のアゴニストを含有してなる細胞遊走刺激剤、
(35) 上記(30)記載のアゴニストを含有してなる抗炎症剤、
(36) 上記(30)記載のアゴニストを含有してなる喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマト
- 5 ーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、
- 10 肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤、
(37) 上記(31)記載のアンタゴニストを含有してなる細胞遊走抑制剤、
(38) 上記(31)記載のアンタゴニストを含有してなる感染症の予防・治
- 15 療剤、
(39) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、
(40) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- 20 (41) 上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
(42) 配列番号：5で表される塩基配列からなるDNA、
(43) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- 25 (44) 上記(43)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
(45) 上記(44)記載の形質転換体を培養し、上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
(46) 上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部

分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(47) 上記(41)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

5 (48) 上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(49) 細胞遊走刺激剤である上記(48)記載の医薬、

(50) 抗炎症剤である上記(48)記載の医薬、

(51) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
10 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血
15 圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である上記(48)記載の医薬、

(52) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(53) 細胞遊走刺激剤である上記(52)記載の医薬、

20 (54) 抗炎症剤である上記(52)記載の医薬、

(55) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血
25 圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である上記(52)

) 記載の医薬、

(56) 上記(41) 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤、

- (57) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
5 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血
10 圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である上記(56) 記載の診断剤、

(58) 上記(46) 記載の抗体を含有してなる診断剤、

- (59) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
15 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心
20 症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である上記(58) 記載の診断剤、

(60) 上記(46) 記載の抗体を含有してなる医薬、

- (61) 細胞遊走抑制剤である上記(60) 記載の医薬、
25 (62) 感染症の予防・治療剤である上記(60) 記載の医薬、
(63) 上記(47) 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
(64) 細胞遊走抑制剤である上記(63) 記載の医薬、
(65) 感染症の予防・治療剤である上記(63) 記載の医薬、

(66) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

5 (67) 上記(41)記載のポリヌクレオチドを含有してなる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(68) 上記(66)記載のスクリーニング方法または上記(67)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

10 (69) 上記(66)記載のスクリーニング方法または上記(67)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を増加させる化合物またはその塩、

15 (70) 上記(66)記載のスクリーニング方法または上記(67)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を減少させる化合物またはその塩、

(71) 上記(66)記載のスクリーニング方法または上記(67)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

20 (72) 上記(66)記載のスクリーニング方法または上記(67)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を増加させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(73) 細胞遊走刺激剤である上記(72)記載の医薬、

(74) 抗炎症剤である上記(72)記載の医薬、

25 (75) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結

核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である上記（72）記載の医薬、

- 5 (76) 上記(66) 記載のスクリーニング方法または上記(67) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(39) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を減少させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
 (77) 細胞遊走抑制剤である上記(76) 記載の医薬、
 (78) 感染症の予防・治療剤である上記(76) 記載の医薬、
- 10 (79) 哺乳動物に対して、(i) 上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 上記(6) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(iii) 上記(39) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または(iv) 上記(41) 記載のポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする
- 15 細胞遊走刺激方法、または喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療方法、
 (80) 細胞遊走刺激剤または喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、
- 20 アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺
- 25

サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤を製造するための (i) 上記 (1) 記載のペプチド、そのアミドもしくは
5 はそのエステルまたはその塩、 (ii) 上記 (6) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、 (iii) 上記 (39) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (iv) 上記 (41) 記載のポリヌクレオチドの使用、

(81) 哺乳動物に対して、 (i) 上記 (15) 記載の抗体、 (ii) 上記 (1
10 6) 記載の抗体、 (iii) 上記 (46) 記載の抗体、または (iv) 上記 (47) 記載のポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする細胞刺激抑制方法、または感染症の予防・治療方法、

(82) 細胞刺激抑制剤または感染症の予防・治療剤を製造するための (i) 上記 (15) 記載の抗体、 (ii) 上記 (16) 記載の抗体、 (iii) 上記 (46
15) 記載の抗体、または (iv) 上記 (47) 記載のポリヌクレオチドの使用を提供する。

さらに、本発明は、

(83) 上記 (41) 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記 (39) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの
20 定量法、

(84) 上記 (46) 記載の抗体を用いることを特徴とする上記 (39) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の定量法、

(85) (i) F P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩と、①上記 (1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レ
25 セプター蛋白質またはその塩と上記 (1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩とを接触させた場合と、 (ii) F P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩と、① 上記 (1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または② F P R L 1 またはその塩と上記 (1) 記載のペプチド、そのアミドもし

くはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記

(24) 記載のスクリーニング方法、

- (86) (i) ①標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1 またはその塩と上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩をF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1 またはその塩と上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記(24) 記載のスクリーニング方法、

- (87) (i) ①標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1 またはその塩と上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩をF P R L 1 を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1 またはその塩と上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1 を含有する細胞に接触させた場合における、標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記(24) 記載のスクリーニング方法、

(88) (i) ①標識した上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1 またはその塩と上記(1) 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化さ

- せる標識した化合物またはその塩をF P R L 1を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を
- 5 変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記(24)記載のスクリーニング方法、
- 10 (89) (i) ①標識した上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を变化させる標識した化合物またはその塩を、F P R L 1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養すること
- 15 によって当該形質転換体の細胞膜に発現したF P R L 1に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を变化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を当該質転換体の細胞膜に発現した
- 20 F P R L 1に接触させた場合における、標識した上記(1)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のF P R L 1に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記(24)記載のスクリーニング方法、
- (90) (i) F P R L 1を活性化する化合物をF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) F P R L 1を活性化する化合物および試験化合物を
- 25 F P R L 1を含有する細胞に接触させた場合における、F P R L 1を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記(24)記載のスクリーニング方法、
- (91) F P R L 1を活性化する化合物を、F P R L 1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養す

ることによって当該形質転換体の細胞膜に発現したF P R L 1に接触させた場合と、F P R L 1を活性化する化合物および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したF P R L 1に接触させた場合における、F P R L 1を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記（24）記載のスクリーニング方法、

（92）F P R L 1を活性化する化合物が①上記（1）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記（1）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩である上記（90）または（91）記載のスクリーニング方法、

（93）F P R L 1を含有する細胞またはその膜画分を含有することを特徴とする上記（27）記載のスクリーニング用キット、

（94）F P R L 1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したF P R L 1を含有することを特徴とする上記（27）記載のスクリーニング用キット、

（95）（i）F P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩と、①上記（1）または（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩とを接触させた場合と、（ii）F P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩と、①上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（25）記載のスクリーニング方法、

（96）（i）①標識した上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記（6）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化さ

- せる標識した化合物またはその塩をF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のF P R L 1、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記(25)記載のスクリーニング方法、
- 10 (97) (i) ①標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩をF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) ①標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはその
- 15 エステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合における、標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較
- 20 することを特徴とする上記(25)記載のスクリーニング方法、
- (98) (i) ①標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩をF P R L 1を含有する細胞の膜面分に接触
- 25 させた場合と、(ii) ①標識した上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記(6)記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物をF P R L 1を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した上記(6)記載のペ

プチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記（２５）記載のスクリーニング方法、

- （９９）（ｉ）①標識した上記（６）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②FPRL1またはその塩と上記（６）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を变化させる標識した化合物またはその塩を、FPRL1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPRL1に接触させた場合と、
- 10 （ii）①標識した上記（６）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②FPRL1またはその塩と上記（６）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を变化させる標識した化合物またはその塩、および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPRL1に接触させた場合における、標識した上記（６）記載のペプチド、
- 15 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩のFPRL1に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記（２５）記載のスクリーニング方法、
- （１００）（ｉ）FPRL1を活性化する化合物をFPRL1を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）FPRL1を活性化する化合物および試験化合物をFPRL1を含有する細胞に接触させた場合における、FPRL1を介した
- 20 細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記（２５）記載のスクリーニング方法、
- （１０１）FPRL1を活性化する化合物を、FPRL1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPRL1に接触させた
- 25 場合と、FPRL1を活性化する化合物および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPRL1に接触させた場合における、FPRL1を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記（２５）記載のスクリーニング方法、

（１０２）FPRL1を活性化する化合物が①上記（６）記載のペプチド、そ

- のアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②F P R L 1またはその塩と上記（３）記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩である上記（１００）または（１０１）記載のスクリーニング方法、
- 5 （１０３）F P R L 1を含有する細胞またはその膜画分を含有することを特徴とする上記（２８）記載のスクリーニング用キット、
- （１０４）F P R L 1をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したF P R L 1を含有することを特徴とする上記（２８）記載の
- 10 スクリーニング用キット、
- （１０５）哺乳動物に対して、（i）上記（３０）記載のアゴニストまたは（ii）上記（６９）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭
- 15 部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、
- 20 心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療方法、
- （１０６）哺乳動物に対して、（i）上記（３０）記載のアゴニストまたは（ii）上記（６９）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする細胞遊走刺激方法、
- 25 （１０７）喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、

毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤を製造するための (i) 上記 (30) 記載のアゴニストまたは (ii) 上記 (69) 記載の化合物またはその塩の使用、

(108) 細胞遊走刺激剤を製造するための (i) 上記 (30) 記載のアゴニストまたは (ii) 上記 (69) 記載の化合物またはその塩の使用、

(109) 哺乳動物に対して、(i) 上記 (31) 記載のアンタゴニストまたは (ii) 上記 (70) 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする感染症の予防・治療方法、

(110) 哺乳動物に対して、(i) 上記 (31) 記載のアンタゴニストまたは (ii) 上記 (70) 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする細胞遊走抑制方法、

(111) 感染症の予防・治療剤を製造するための (i) 上記 (31) 記載のアンタゴニストまたは (ii) 上記 (70) 記載の化合物またはその塩の使用、

(112) 細胞遊走抑制剤を製造するための (i) 上記 (31) 記載のアンタゴニストまたは (ii) 上記 (70) 記載の化合物またはその塩の使用等を提供する。

20

図面の簡単な説明

図1はホルスコリンで刺激しない状態 (Basal) に対し、ホルスコリン (FSK) を $1 \mu\text{M}$ および図中に表示のブタ抽出液フラクション1~12 (Frac. 1~12) をホルスコリン (FSK) と同時に添加してインキュベーションし、細胞内 cAMP 量を比較した結果を示す。上の段は 0.05 g/well 相当の抽出液を、下の段は 0.5 g/well 相当の抽出液を添加した結果を示す。右段 (mock) はヒト FPR L1-GFP を発現していない mock 細胞を、左段はヒト FPR L1-GFP を発現させた CHO 細胞 (FPR L1-GFP) を用いた結果を示す。縦軸は細胞内 cAMP 濃度 (pmol/l)

w e l l) を示す。

図2はブタ胃からの内因性F P R L 1リガンドの逆相カラムd i p h e n y l
2 1 9 T P 5 2 (V y d a c) による最終精製結果を示す。上段はクロマトグ
ラフのパターンを示す。図中の実線は2 1 4 n m の吸光度 (A 2 1 4 (m A U
5)) および溶出のアセトニトリル濃度 (C H ₃ C N (%)) を示す。中段は、上
段の図において活性が溶出され溶出液を分取した部分の拡大図である。2 1 4
n m の吸光度 (A 2 1 4 (m A U)) と分取したフラクション (F r .) を示
す。また、活性と一致したピークにマークしてある。下段は、中段の図で示さ
れた分取した各フラクション (V y d a c d i p h e n l 2 1 9 T P 5 2
10 f r a c t i o n 1 ~ 4 0) におけるヒト型F P R L 1 - G F P 発現C H O
細胞特異的な細胞内c A M P 産生抑制活性 (I n h i b i t i o n (%)) を
示す。

図3はブタ内因性F P R L 1リガンドP 3のマトリックスアシスティッドレー
ザーデソーブションイオン化飛行時間型質量装置によるマスペクトルを示す。
15 横軸 (M a s s) は質量/電荷 (m / z) 、縦軸 (% I n t e n s i t y)
はもっとも強いシグナルを1 0 0 % としたときの相対強度を示す。図中シグ
ナルにラベルされている数値は、各シグナルの分子関連イオン (M + H ⁺) のm /
z の値を示す。

図4はブタ内因性F P R L 1リガンドP 3のエレクトロスプレイイオン化質量
20 分析装置によるマスペクトルを示す。横軸は質量/電荷 (m / z) を示す。
縦軸はもっとも強いシグナルを1 0 0 % としたときの相対強度を示す。図中シ
グナルにラベルされている数値はm / z の値を示す。

図5はm / z 5 8 0 . 6 を親イオンとしたM S / M S スペクトルを質量分析
装置付属の解析ソフトM a x E n t 3 を用いて1 価変換したものを示す。横軸
25 は質量/電荷 (m / z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを1 0 0 % とし
たときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値はm / z の値
を示すC 末端側を含む系列 (y 系列) の一連のイオンによる解析結果をスペク
トル上部に記した。

図6はブタ内因性F P R L 1リガンドP 3のエレクトロスプレイイオン化質量

分析装置によるマスペクトルを示す。ブタ内因性F P R L 1 リガンドP 3 の内部配列分析結果を示す。横軸 (R e s i d u e n u m b e r) はアミノ酸残基の順番を、縦軸は各サイクルに出現したフェニルチオヒダントイン (P T H) - アミノ酸の量を、図中に表記したアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す。

5 図 7 はブタ胃からの内因性F P R L 1 リガンドの逆相カラム μ R P C C 2 / C 1 8 S C 2 . 1 / 1 0 による最終精製結果を示す。上段はクロマトグラフのパターンを示す。図中の実線は 2 1 5 n m の吸光度および溶出のアセトニトリル濃度を示す。アセトニトリルによる溶出は 2 2 ~ 2 4 % の濃度勾配で行なった。中段は、上段の図において活性が溶出され溶出液を分取した部分の拡大図である。2 1 5 n m の吸光度と分取したフラクションを示す。また、活性と一致したピークに矢印でマークしてある。下段は、中段の図で示された分取した各フラクションにおけるヒト型F P R L 1 - G F P 発現 C H O 細胞特異的な細胞内 c A M P 産生抑制活性を示す。

15 図 8 はブタ内因性F P R L 1 リガンドP 1 のマトリックスアシスティッドレーザーデソープションイオン化飛行時間型質量装置によるマスペクトルを示す。横軸 (M a s s) は質量/電荷 (m/z)、縦軸はもっとも強いシグナルを 1 0 0 % としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は、各シグナルの分子関連イオン ($M+H^+$) の m/z の値を示す。

20 図 9 はブタ内因性F P R L 1 リガンドP 1 のエレクトロスプレーイオン化質量分析装置によるマスペクトルを示す。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを 1 0 0 % としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。

図 1 0 は図 9 の 3 価分子関連イオン ($M+3H^3+$) の拡大図を示す。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを 1 0 0 % としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。

25 図 1 1 はブタ内因性F P R L 1 リガンドP 1 のエレクトロスプレーイオン化質量分析装置によるMS/MS スペクトルを示す。2 価イオンを親イオンとした

MS/MS スペクトルである。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを 100% としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。N 末端側を含む系列 (y 系列) の一連のイオンによる解析結果をスペクトル上部に記した。

- 5 図 1 2 はブタ内因性 F P R L 1 リガンド P 1 の 4 価イオンを親イオンとした M S / M S スペクトルを示す。質量分析装置付属の解析ソフト M a x E n t 3 を用いて 1 価変換したものである。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを 100% としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。N 末端側を含む系列 (b 系列)
- 10 の一連のイオンによる解析結果をスペクトル上部に記した。

図 1 3 はブタ内因性 F P R L 1 リガンド P 1 の配列分析結果を示す。横軸 (R e s i d u e n u m b e r) はアミノ酸残基の順番を、縦軸は各サイクルに出現したフェニルチオヒダントイン (P T H) - アミノ酸の量を、図中表記したアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す。

- 15 図 1 4 はヒト型 F P R L 1 - G F P 発現 CHO 細胞特異的な細胞内 c A M P 産生抑制活性を示す。横軸の P e p t i d e (nM) はペプチドの濃度 (nM) を示す。縦軸の I n h i b i t i o n (%) は細胞内 c A M P 産生抑制活性 (I n h i b i t i o n (%)) を示す。▲は実施例 7 で精製された内因性 F P R L 1 リガンド P 1 の活性を示す。最終精製標品 u R P C C 2 / C 1 8 S
- 20 C 2 . 1 / 1 0 の f r . 2 4 - 2 5 由来であり、そのペプチド濃度は、最終精製クロマトの 2 1 5 n m の吸光度からの推定濃度である。●は、合成した N 末端がホルミル化されたブタ型 C y t o c h r o m e B N 末端 1 5 アミノ酸を含有する 1 6 アミノ酸ペプチド (f o r m y l - M T N I R K S H P L M K I I N N) の活性を示す。

- 25 図 1 5 はブタ胃からの内因性 F P R L 1 リガンドの逆相カラム d i p h e n y l 2 1 9 T P 5 2 1 5 (V y d a c) による最終精製結果を示す。上段は、クロマトグラフのパターンを示す。図中の実線は 2 1 4 n m (上) および 2 8 0 n m (下) の吸光度を示す。矢印は、精製された F P R L 1 リガンド P 4 のピークを示す。R e t e n t i o n t i m e (m i n) は溶出時間 (分) を

示す。21～59はフラクションの番号を示す。下段は上段に示された各フラクション (Vydac diphenyl 219TP5215のフラクション20～30) におけるヒト型FRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性 (Inhibition (%)) を示す。

- 5 図16はブタ内因性FRL1リガンドP4のマススペクトルを示す。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを100%としたときの相対強度を示す。3価分子関連イオン (m/z 660) とその酸化体イオン (m/z 665) が出現している。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。
- 10 図17はブタ内因性FRL1リガンドP4の酸化体の3価イオン m/z 665. 60を親イオンとしたMS/MSスペクトルを、質量分析装置付属の解析ソフトMaxEnt3を用いて1価変換したものである。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを100%としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。C末端側を含む系列 (y系列) の一連のイオンによる解析結果をスペクトル上部に記した。
- 15 図18はブタ内因性FRL1リガンドP4の m/z 989. 88を親イオンとしたMS/MSスペクトルを、質量分析装置付属の解析ソフトMaxEnt3を用いて1価変換したものである。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを100%としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。N末端側を含む系列 (b系列) の一連のイオンによる解析結果をスペクトル上部に記した。
- 20 図19はブタ内因性FRL1リガンドP4の内部配列分析結果を示す。横軸はアミノ酸残基の順番を、縦軸は各サイクルに出現したフェニルチオヒダントイン (PTH) -アミノ酸の量を、図中表記したアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す。
- 25 図20はブタ胃からの内因性FRL1リガンドの逆相カラムdiphenyl 219TP5215 (Vydac) による最終精製結果を示す。上段はクロマトグラフのパターンを示す。図中の実線は214nm (上) および280

nm (下) の吸光度を示す。矢印は精製されたFPRL1リガンドP2のピークを示す。Retention time (min) は溶出時間 (分) を示す。1~60はフラクションの番号を示す。下段は上段に示された各フラクション (Vydac diphenyl fraction 20~30) における

5 ヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性 (Inhibition (%)) を示す。

図21はブタ内因性FPRL1リガンドP2のエレクトロスプレーイオン化質量分析装置によるマススペクトルを示す。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを100%としたときの相対強度を示す。上段は

10 3価分子関連イオン ($M+3H^{3+}$) の拡大図を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。下段はブタformyl-cytochrome b (1-18) の ($M+3H^{3+}$) イオン理論パターンを示す。

図22はブタ内因性FPRL1リガンドP2のエレクトロスプレーイオン化質量分析装置によるMS/MSスペクトルを示す。2価イオンを親イオンとした

15 MS/MSスペクトルを質量分析装置付属の解析ソフトMaxEnt3を用いて1価変換したものである。横軸は質量/電荷 (m/z) を示す。縦軸はもっとも強いシグナルを100%としたときの相対強度を示す。図中シグナルにラベルされている数値は m/z の値を示す。N末端側を含む系列 (b系列) の一連のイオンによる解析結果をスペクトル上部に記した。

図23はブタ内因性FPRL1リガンドP2の内部配列分析結果を示す。横軸 (Cycle number) はアミノ酸残基の順番を、縦軸は各サイクルに出現したフェニルチオヒダントイン (PTH) -アミノ酸の量を、図中表記したアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す。

図24はFPRL1-GFP融合タンパク質発現CHO細胞に対する各種ペ

25 プチド (ブタFPRL1リガンドP3 (pfCYOX-1 (1-13)) またはヒトFPRL1リガンドP3 (hfCYOX-1 (1-13))) の細胞遊走刺激活性を調べた結果を示す。横軸 (Dose (M)) はペプチド濃度をモル濃度で示した数値である。縦軸 (Absorbance) は染色細胞数を反映した吸光度による細胞遊走活性を表す。◆はpfCYOX-1 (1

－ 1 3) を示す。■は h f C Y O X - 1 (1 - 1 3) を示す。各点 3 連で検定した。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本発明で使用される F P R L 1 は、配列番号： 2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

10 F P R L 1 は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは

15 間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、

20 副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、腸管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、特に、脾臓、骨髄、腸管、単球、マクロファージなどの免疫担当臓器と免疫担当細胞に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

- 25 配列番号： 2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号： 2 で表わされるアミノ酸配列と約 8 5 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは約 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム N C B I B L A S T (

National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; マトリクス=BLOSUM62 ; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。

5 本発明の配列番号 : 2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号 : 2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号 : 2 で表わされるアミノ酸配列からなる F P R L 1 と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

10 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等 (例、約 0.01 ~ 100 倍、好ましくは約 0.5 ~ 20 倍、より好ましくは約 0.5 ~ 2 倍) であることが好ましいが、これらの活性の程度

15 や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

20 また、F P R L 1 としては、a) 配列番号 : 2、配列番号 : 4 または配列番号 : 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ~ 5 個)) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号 : 2、配列番号 : 4 または配列番号 : 6 で表わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上 (好ましくは、

25 1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ~ 5 個)) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号 : 2、配列番号 : 4 または配列番号 : 6 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個 (1 ~ 5 個)) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

- 本明細書におけるF P R L 1は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1
- 5 で表わされるアミノ酸配列を含有するF P R L 1をはじめとするF P R L 1は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- 10

- 15 F P R L 1がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のF P R L 1に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、F P R L 1には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。
- 20
- 25

本発明のF P R L 1の具体例としては、例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来F P R L 1（J. Biol. Chem. 267(11),

7637-7643(1992))、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来F P R L 1、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列からなるマウス由来F P R L 2 (J. Immunol. 169, 3363-3369 (2002)) などが用いられる。

5 配列番号：4で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来F P R L 1は新規な蛋白質である。

F P R L 1の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記したF P R L 1の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、F P R L 1の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

10

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するF P R L 1の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。

15

個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

20 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

25

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「

実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記したF P R L 1と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のF P R L 1またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のF P R L 1またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のF P R L 1をコードするDNAを含有する形質転

換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 5 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

- 10 本発明のF P R L 1もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、P A M樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-F m o cアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

- 20 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、D C C、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、H O B t、H O O B t）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはH O B tエステルあるいはH O O B tエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

25 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることで知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、

N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチル
ピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化
炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキ
シドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなど
5 のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メ
チル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用い
られる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範
囲から適宜選択され、通常約-20~50℃の範囲から適宜選択される。活性
化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反
10 応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことな
く縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰
り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダ
ゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペン
15 チルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジ
ルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、
トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェ
ニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、
20 プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、
シクロヘブチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状も
しくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジル
エステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-
クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステ
25 ル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボ
ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護する
ことができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基など
の低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカル

ボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

- チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz*1、*Cl*₂-*Bz*1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、ターシャリーブチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*To*s、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。
- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。

- 原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホ

ルミル基は上記の 1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 5 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- 10 蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

- 20 本発明のF P R L 1の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のF P R L 1を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のF P R L 1を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa) ~ e)に記載された方法が挙げられる。

a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

b) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

5 d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のF P R L 1をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のF P R L 1をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のF P R L 1をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

20 本発明のF P R L 1をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のF P R L 1のmRNAを定量することができる。

25 本発明のF P R L 1をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅

することもできる。

具体的には、本発明のヒトFPRL1をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列からなるヒトFPRL1と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

本発明のラットFPRL1をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：5で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：5で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列からなるラットFPRL1と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

本発明のマウスFPRL2をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列からなるマウスFPRL2と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算す

ることができる。

- ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

- 該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト F P R L 1 をコードする DNA としては、配列番号：3 で表わされる塩基配列からなる DNA などが用いられる。

- 15 配列番号：4 で表わされるアミノ酸配列からなるラット F P R L 1 をコードする DNA としては、配列番号：5 で表わされる塩基配列からなる DNA などが用いられる。

- 20 配列番号：6 で表わされるアミノ酸配列からなるマウス F P R L 2 をコードする DNA としては、配列番号：7 で表わされる塩基配列からなる DNA などが用いられる。

本発明の F P R L 1 をコードする DNA の塩基配列の一部、または該 DNA と相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードする DNA を包含するだけでなく、RNA をも包含する意味で用いられる。

- 25 本発明に従えば、F P R L 1 遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド (核酸) を、クローン化した、あるいは決定された F P R L 1 をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド (核酸) は、F P R L 1 遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成または機能を阻害することが

- できるか、あるいはF P R L 1 関連RNAとの相互作用を介してF P R L 1 遺伝子の発現を調節・制御することができる。F P R L 1 関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびF P R L 1 関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で
- 5 F P R L 1 遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。F
- 10 P R L 1 遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、O R F 翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パ lindローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、F P R L 1 遺伝子
- 15 内の如何なる領域も対象として選択しうる。
- 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるとい
- うことができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有し
- 20 ているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許
- 25 容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化された

- もの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基を持つようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってもよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 20 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 5 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホス
- 10 ホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3
- 15 ' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。
- 20 アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

- 25 本発明のポリヌクレオチドに対する siRNA は、FPRL1 をコードする RNA の一部とそれに相補的な RNA を含有する二重鎖 RNA である。

siRNA は、公知の方法（例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

FPRL1 をコードする RNA の一部を含有するリボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221 頁, 2001 年）に準じて、本発

明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部をF P R L 1をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。F P R L 1をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列N U X

5 (式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す)の近傍の配列などが挙げられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、R T - P C R法と略称する)

10)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列からなるF P R L 1 (ヒト由来F P R L 1、ラット由来F P R L 1またはマウスF P R L 2)と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

20

25

配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA

などが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3)にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションの方法および条件は、前記と同様である。

本発明のF P R L 1またはその部分ペプチド(以下、本発明のF P R L 1と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のF P R L 1の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のF P R L 1の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mut anTM-super Express Km (宝酒造(株))、Mut anTM-K (宝酒造(株))などを用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたF P R L 1をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合

成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のF P R L 1の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のF P R L 1をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p U C 1 2、p U C 1 3)、枯草菌由来のプラスミド(例、p U B 1 1 0、p T P 5、p C 1 9 4)、酵母由来プラスミド(例、p S H 1 9、p S H 1 5)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、p A 1 - 1 1、p X T 1、p R c / C M V、p R c / R S V、p c D N A I / N e oなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、S R α プロモーター、S V 4 0プロモーター、L T Rプロモーター、C M Vプロモーター、H S V - T Kプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、C M Vプロモーター、S R α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、t r pプロモーター、l a cプロモーター、r e c Aプロモーター、 λ P_Lプロモーター、l p pプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、S P O 1プロモーター、S P O 2プロモーター、p e n Pプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、P H O 5プロモーター、P G Kプロモーター、G A Pプロモーター、A D Hプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P 1 0プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0複製オリジン(以下、S V 4 0 o r iと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、d

h f r と略称する場合がある) 遺伝子 [メソトレキセート (MTX) 耐性]、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、Amp^r と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo^r と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性) 等が挙げられる。特に、CHO (d h f r⁻) 細胞を用いて d h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のF P R L 1をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K 1 2・DH 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 6 0 巻, 1 6 0 (1 9 6 8)], J M 1 0 3 [ヌクイレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9 巻, 3 0 9 (1 9 8 1)], J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 1 2 0 巻, 5 1 7 (1 9 7 8)], H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 4 1 巻, 4 5 9 (1 9 6 9)], C 6 0 0 [ジェネティックス (Genetics), 3 9 巻, 4 4 0 (1 9 5 4)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (Bacillus subtilis) M I 1 1 4 [ジーン, 2 4 巻, 2 5 5 (1 9 8 3)], 2 0 7-2 1 [ジャー

ナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D、20
5 B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の
10 中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)
15 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592 (1985)] 。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャ
20 イニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエ
25 ー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 11

1 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユ
5 ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、FPRL1をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、
20 ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ
25 ミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えること

ができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や
10 0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
15

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃
20 で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] など
25 などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～4

0℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のF P R L 1を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のF P R L 1を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のF P R L 1を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりF P R L 1の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にF P R L 1が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるF P R L 1の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるF P R L 1が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するF P R L 1を、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシ

ン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- かくして生成する本発明のF P R L 1の活性は、標識したリガンド（F P R L 1リガンド）との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のF P R L 1に対する抗体は、本発明のF P R L 1を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のF P R L 1に対する抗体は、本発明のF P R L 1を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

10 〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 本発明のF P R L 1は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256巻、495頁（1975年）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と

- 同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。
- 5

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（F P R L 1 抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のF P R L 1 に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。
- 10

- 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、
- 15
- どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

- また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。
- 20

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。
- 25

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と

同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

5 本発明のFPRL1リガンドは、配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、好ましくは配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるペプチドである。

10 FPRL1リガンドは、ヒトや非ヒト温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋などに由来するポリペプチドであつてもよく、組換えポリペプチドであつてもよく、合成ポリペプチドであつてもよい。

25 「実質的に同一」とはFPRL1リガンドの活性、例えば、FPRL1への結合活性、細胞内シグナル伝達活性、抗炎症作用など、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入が、ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさない限り、当該置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、当該置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一である。該アミノ酸

配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。

5 非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

10 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、該アミノ酸配列を含有するペプチドが、配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなるFPRL1リガンドと実質的に同一の活性（性質）を有する限り、特に限定されるものではなく、例えば
15 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

20 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST（National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool）を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

25 上記の実質的に同質の活性（性質）としては、例えば、配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなるFPRL1リガンドのFPRL1への結合活性、細胞内シグナル伝達活性、抗炎症作用などが定性的に同質であることを示す。

また、配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：2

3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するF P R L
1リガンドとしてより具体的には、例えば、a) 配列番号：1、配列番号：1
6、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配
列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24で表さ
5れるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～3個程度、好ましくは1
または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：1、配列番
号：16、配列番号：17、配列番号：18配列番号：19、配列番号：20、
配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24で表
10されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～3個程度、好ましくは1
または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：1、配列番
号：16、配列番号：17、配列番号：18配列番号：19、配列番号：20、
配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24で表
されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～3個程度、好ましくは
1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または
15d) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるペプチド
などが用いられる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されて
いる場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

また、F P R L 1リガンドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当
な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチド
20などの複合ペプチドなども含まれる。

さらに、F P R L 1リガンドには、おのこのN末端またはC末端などにエ
ピトープ（抗体認識部位）となりうる任意の外来ペプチド配列（例えば、F L
A G、H i s タグ、H A タグ、H S V タグなど）を有しているものも含まれる。

F P R L 1リガンドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ
25末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表される
アミノ酸配列からなるペプチドをはじめとするF P R L 1リガンドは、C末端
がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）
またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピ

ル、イソプロピルもしくは n -ブチル等の C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等の C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチル等の C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチル等の α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基等の C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基等が用いられる。

F P R L 1 リガンドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本願明細書におけるF P R L 1 リガンドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。

さらに、F P R L 1 リガンドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等の C_{1-6} アルカノイル等の C_{1-6} アシル基等）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等の C_{1-6} アルカノイル基等の C_{1-6} アシル基等）で保護されているもの、糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド、C末端のアミノ酸残基が修飾されているもの等も含まれる。特に、N末端のメチオニン残基のアミノ基がホルミル基で保護されている場合が好ましく、この場合、さらに上記した保護、修飾等を受けていてもよい。

具体的には、F P R L 1 リガンドとしては、例えば、

- (1) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1 リガンド（P 3）、
- 25 (2) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：16で表わされるアミノ酸配列からなるヒト型F P R L 1 リガンド（P 3）、
- (3) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：17で表わされるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1 リガンド（P 1）A、
- (4) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：18で表わ

- されるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1リガンド (P 1) B、
- (5) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるヒト型F P R L 1リガンド (P 1) A、
- (6) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：20で表わ
- 5 されるアミノ酸配列からなるヒト型F P R L 1リガンド (P 1) B、
- (7) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：21で表されるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1リガンド (P 4)、
- (8) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなるヒト型F P R L 1リガンド (P 4)、
- 10 (9) N末端のメチオニン残基がホルミル化され、C末端のイソロイシン残基が修飾されている配列番号：21で表されるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1リガンド (P 4)、
- (10) N末端のメチオニン残基がホルミル化され、C末端のイソロイシン残基が修飾されている配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなるヒト型F
- 15 P R L 1リガンド (P 4)、
- (11) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：23で表されるアミノ酸配列からなるブタ型F P R L 1リガンド (P 2)、
- (12) N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：24で表されるアミノ酸配列からなるヒト型F P R L 1リガンド (P 2) などが好ましく用いられる。
- 20

P 1およびP 2はチトクロームBのN末端ペプチドに相当する。P 3およびP 4はチトクロームCオキシダーゼのN末端ペプチドに相当する。

- さらに、本発明のF P R L 1リガンドとしては、前述した「配列番号：1、配列番号：17、配列番号：21または配列番号：23で表されるアミノ酸配
- 25 列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド」以外に、ホルミル化されているアミノ酸またはN末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）がホルミル化されているペプチド（ただし、バクテリア由来のホルミル化されたMLP、N末端がホルミル化されたNADH d e h y d r o g e n a s eまたはその部分ペプチドを除く）であれば、同様に使用することができる。

「N末端のアミノ酸残基がホルミル化されているペプチド」の「ペプチド」部分は、生体内由来のペプチドであってもよいし、合成ペプチドであってもよい。

「ペプチド」部分のアミノ酸の数は、通常2～50個、好ましくは2～20個である。

- 5 F P R L 1 リガンドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩等が用いられる。
- 10

F P R L 1 リガンドは、前述したヒトや非ヒト温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

- 15 ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、得られた抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

- 20 F P R L 1 リガンドまたはそのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂等をあげることができる。
- 25
- このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に

各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

- 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対応する酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N'-ジメチルホルムアミド、N, N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフル

オロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc等が用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘ
5 プチル、シクロオクチル、2-アダマンチル等の直鎖状、分枝状もしくは環状
アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、
4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベ
ンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベン
10 ジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、
トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護する
ことができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基等の
低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシ
15 カルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられ
る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド
ロピラニル基、*t*-ブチル基等である。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-
Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチル等が用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ
20 シー2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメ
チル、Bum、Boc、Trt、Fmoc等が用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無
水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、
2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメ
25 チルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミ
ド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕等が用いられる。

原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミ
ドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素

- 等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液等による酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール等のようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオール等の存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。
- 15 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。
- 20 F P R L 1 リガンドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のF P R L 1 リガンドのアミド体を得ることができる。
- 25

F P R L 1 リガンドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルと

した後、F P R L 1 リガンドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

F P R L 1 リガンドは、公知のペプチドの合成法に従っても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、F P R L 1 リガンドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法などが挙げられる。

- 10 ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)、
- ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)、
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)、
- 15 ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)、および
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店。

- また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペプチド、本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

- 25 F P R L 1 リガンドに対する抗体は、本発明のF P R L 1 に対する抗体と同様にして製造することができる。

F P R L 1 リガンドは炎症などの疾患に関与していることから、F P R L 1 リガンド (またはF P R L 1 リガンドをコードするDNA)、F P R L 1、F P R L 1 をコードするDNA (以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、

F P R L 1 リガンドまたは F P R L 1 に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、本発明の DNA に対する アンチセンス DNA（以下、本発明の アンチセンス DNA と略記する場合がある）は、以下の用途を有している。

5 (1) 本発明の F P R L 1 の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤

- F P R L 1 リガンドは、例えば、細胞遊走刺激活性（例えば、好中球、マクロファージ、ミクログリアなどの細胞の遊走刺激活性）を有している。また、F P R L 1 リガンド、F P R L 1 またはそれをコードするポリヌクレオチド（例、DNA 等）などに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または亢進している場合、例えば、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの種々の疾病が発症する。
- 10
15
20
25

したがって、生体内において F P R L 1 リガンドまたは F P R L 1 が減少しているために、F P R L 1 リガンドの生理作用が期待できない（F P R L 1 リガンドまたは F P R L 1 の欠乏症）患者がいる場合に、a) F P R L 1 リガンドまたは F P R L 1 を該患者に投与し、F P R L 1 リガンドまたは F P R L 1

の量を補充したり、b) (イ) FPRL1をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞にFPRL1をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるFPRL1リガンドまたはFPRL1の量を増加させ、FPRL1リガンドの作用を十分に発揮させることができる。

したがって、a) FPRL1リガンド、b) FPRL1またはc) FPRL1をコードするDNAを、FPRL1リガンドまたはFPRL1の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

具体的には、FPRL1リガンド、FPRL1または本発明のDNAは、例えば、細胞遊走刺激剤（あるいは細胞遊走促進剤）、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

FPRL1リガンドまたはFPRL1を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明の

DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカ
5 テーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、a) FPRL1リガンド、b) FPRL1またはc) 本発明のDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容
10 できる液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) FPRL1リガンド、b) FPRL1またはc) 本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、
25 例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例え

ば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

例えば、F P R L 1 リガンドの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

本発明の DNA の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投

与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(2) 遺伝子診断剤

5 本発明のDNAおよびアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のFPRL1またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

10 本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

20 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりFPRL1の発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、

- 感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、
- 5 透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 一方、ノーザンハイブリダイゼーションにより F P R L 1 の過剰発現が検出された場合や P C R - S S C P 法により DNA の突然変異が検出された場合は、例えば、F P R L 1 の過剰発現に起因する疾患（例えば、感染症など）である、
- 10 または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- また、ノーザンハイブリダイゼーションにより F P R L 1 の過剰発現が検出された場合や P C R - S S C P 法により DNA の突然変異が検出された場合であっても、例えば、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison' s disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、
- 15 乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、
- 20 炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn' s disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（
- 25 例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

（3）本発明の F P R L 1 の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有す

る医薬

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のF P R L 1の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

- 5 すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本発明のF P R L 1のmRNA量を測定することによる、本発明のF P R L 1の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 10 本発明のF P R L 1のmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例えば、免疫調節薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。
- 15

- 得られた細胞に含まれる本発明のF P R L 1のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、T a q M a n P C Rなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行うことにより解析することもできる。
- 20

- (ii) 本発明のF P R L 1を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のF P R L 1のmRNAを同様にして定量、解析することができる。
- 25

本発明のF P R L 1の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30

分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前)もしくは一定時間後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、細胞に含まれる本発明のF P R L 1のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後(1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後)、該形質転換体に含まれる本発明のF P R L 1のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、本発明のF P R L 1の発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)本発明のF P R L 1の発現量を増加させることにより、F P R L 1を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性、細胞遊走刺激活性(あるいは細胞遊走促進活性)など、特に細胞内cAMP生成抑制活性、細胞遊走刺激活性(あるいは

細胞遊走促進活性) など) を増強させる化合物、(ロ) 本発明のF P R L 1 の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

上記スクリーニング方法で得られる化合物またはその塩は、

- (1) 本発明のF P R L 1 の発現量を増加し、本発明のF P R L 1 の機能不全に関連する疾患を予防・治療する化合物またはその塩、具体的には、(i) 細胞遊走刺激活性(あるいは細胞遊走促進活性)を有する化合物、(ii) 抗炎症作用を有する化合物、(iii) 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病(Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害(例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症)、髄膜炎、糖尿病、関節炎(例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎)、毒血症(例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群)、炎症性腸疾患(例、クローン病(Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎)、炎症性肺疾患(例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核)、あるいは悪液質(例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群(エイズ)による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染(例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイ

ルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群などを予防・治療する化合物、免疫不全などを予防・治療する化合物、またはその塩、または

- (2) 本発明のF P R L 1の発現量を減少させ、(i) 細胞遊走抑制活性を有する化合物、(ii) 本発明のF P R L 1の発現過多に起因する疾患(例えば、感染症など)を予防・治療する化合物などである。

- したがって、上記スクリーニング方法で得られる本発明のF P R L 1の発現量を増加する化合物またはその塩は、例えば、低毒性で安全な細胞遊走刺激剤(あるいは細胞遊走促進剤)、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病(Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害(例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症)、髄膜炎、糖尿病、関節炎(例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎)、毒血症(例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群)、炎症性腸疾患(例、クローン病(Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎)、炎症性肺疾患(例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核)、あるいは悪液質(例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群(エイズ)による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染(例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤として使用することができる。
- 一方、上記スクリーニング方法で得られる本発明のF P R L 1の発現量を減少させる化合物またはその塩は、例えば、細胞遊走抑制剤として、さらには、本発明のF P R L 1の発現過多に起因する疾患(例えば、感染症など)に対する低毒性で安全な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

また、上記スクリーニング方法で得られる本発明のF P R L 1の発現量を減

- 少させる化合物またはその塩も、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病 (Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病 (Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群 (エイズ) による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤として使用することができる。
- 5
10
15

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 20 例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくははそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。
- 25

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性

- セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプ
- 5 イブの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-
- 10 -マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベン
- 15 ジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防
- 20 止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき本発明の F P R L 1 の発現量を増加させる化合物またはその塩を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、

その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、炎症患者（体重60kgとして）においては、一日につき本発明のF P R L 1の発現量を増加させる化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(4) 本発明の抗体を用いる診断方法

F P R L 1リガンドに対する抗体は、本発明のF P R L 1リガンドを特異的に認識することができるので、被検液中のF P R L 1リガンドの検出や中和に使用することができる。

本発明のF P R L 1に対する抗体は、本発明のF P R L 1を特異的に認識することができるので、被検液中のF P R L 1の検出や中和に使用することができる。

以下、本発明のF P R L 1に対する抗体を用いるF P R L 1の定量法について説明するが、F P R L 1リガンドに対する抗体を用いるF P R L 1リガンドの定量法も同様にして実施することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化されたF P R L 1とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたF P R L 1の割合を測定することを特徴とする被検液中のF P R L 1の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のF P R L 1の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体がF P R L 1のN端部を認識する抗体で、他方の抗体がF P R L 1のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、F P R L 1に対するモノクローナル抗体を用いてF P R L 1の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これら

の目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

- 本発明の抗体を用いる $F P R L 1$ の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、 $F P R L 1$ 量）に対応した抗体、抗原も
- 5 しくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。
- 10 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、
- 15 リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。
- 20 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常 $F P R L 1$ あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。
- 25 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の $F P R L 1$ 量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらし

て行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 5 本発明のサンドイッチ法によるF P R L 1の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、F P R L 1の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、F P R L 1のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、
- 10 例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し
- 15 (B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い
- 20 第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの
- 25 相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のF P R L 1の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のF P R L 1を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いてF P R L 1の濃度を定量することによって、F P R L 1の濃度の減少が検出された場合、例えば、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病 (Addison' s disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn

's disease)、潰瘍性大腸炎)、炎症性肺疾患(例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核)、あるいは悪液質(例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群(エイズ)による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染(例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

一方、F P R L 1の濃度の増加が検出された場合には、例えば、F P R L 1の過剰発現に起因する疾患(例えば、感染症など)である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、F P R L 1の濃度の増加が検出された場合であっても、例えば、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病(Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害(例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、エイズ脳症)、髄膜炎、糖尿病、関節炎(例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎)、毒血症(例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群)、炎症性腸疾患(例、クローン病(Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎)、炎症性肺疾患(例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核)、あるいは悪液質(例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群(エイズ)による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染(例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(5) 本発明のF P R L 1とF P R L 1リガンドとの結合性またはシグナル伝

達を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）またはその塩のスクリーニング方法、および本発明のF P R L 1とF P R L 1リガンドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬

- 5 本発明のF P R L 1を用いるか、または組換え型F P R L 1の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- 10 このような化合物には、（イ）F P R L 1を介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明のF P R L 1に対するアゴニスト）、（ロ）F P R L 1を介する細胞刺激活性を阻害する化合物（いわゆる、本発明のF P R L 1に対するアンタゴニスト）、（ハ）F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

- 15 細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C a ²⁺遊離、細胞内c AMP生成、細胞内c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o sの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性、細胞遊走刺激活性（あるいは細胞遊走促進活性）などが挙げられ、なかでも細胞内c AMP生成抑制活
- 20 性、細胞遊走刺激活性（あるいは細胞遊走促進活性）が好ましい。

- すなわち、本発明は、（i）本発明のF P R L 1とF P R L 1リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のF P R L 1とF P R L 1リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするF P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物
- 25 またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、F P R L 1に対するF P R L 1リガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

F P R L 1リガンドとしては、前記したF P R L 1リガンドに代えて、F P

RL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性を变化させる化合物またはその塩（例えば、低分子合成化合物、好ましくは低分子合成アゴニスト）を用いることができる。FPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性を变化させる化合物またはその塩は、後述するスクリーニング方法を用いて得ることができる。本発明のスクリーニング方法においては、これらFPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性を变化させる化合物またはその塩も含めてFPRL1リガンドと称する。

より具体的には、本発明は、

10 a) 標識したFPRL1リガンドを、本発明のFPRL1に接触させた場合と、標識したFPRL1リガンドおよび試験化合物を本発明のFPRL1に接触させた場合における、標識したFPRL1リガンドの該FPRL1に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするFPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 b) 標識したFPRL1リガンドを、本発明のFPRL1を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したFPRL1リガンドおよび試験化合物を本発明のFPRL1を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したFPRL1リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするFPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 c) 標識したFPRL1リガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したFPRL1に接触させた場合と、標識したFPRL1リガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のFPRL1に接触させた場合における、標識したFPRL1リガンドの該FPRL1に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするFPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

d) 本発明のF P R L 1を活性化する化合物（例えば、本発明のF P R L 1に対するF P R L 1リガンドなど）を本発明のF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のF P R L 1を活性化する化合物および試験化合物を本発明のF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合における、F P R L 1を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするF P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

e) 本発明のF P R L 1を活性化する化合物（例えば、本発明のF P R L 1に対するF P R L 1リガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のF P R L 1に接触させた場合と、本発明のF P R L 1を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のF P R L 1に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするF P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のF P R L 1としては、上記した本発明のF P R L 1を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のF P R L 1を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のF P R L 1などが適している。

本発明のF P R L 1を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のF P R L 1をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主と

するバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267 巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のF P R L 1を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したF P R L 1であってもよいし、該F P R L 1を含有する細胞を用いてもよく、また該F P R L 1を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のF P R L 1を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のF P R L 1を含有する細胞としては、該F P R L 1を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速 (500 ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したF P R L 1と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該F P R L 1を含有する細胞や膜面分中のF P R L 1の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のa)～c)を実施するためには、例えば、適当なF P R L 1画分と、標識したF P R L 1リガンドが必要である。

10 F P R L 1画分としては、天然型のF P R L 1画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型F P R L 1画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したF P R L 1リガンドとしては、例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたF P R L 1リガンドなどが用いられる。

15 具体的には、F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングを行なうには、まず本発明のF P R L 1を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりF P R L 1標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのF P R L 1リガンドとF P R L 1との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやF P R L 1リガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01～10mlの該レセプター蛋白質溶液に、一定量（5000～500000cpm）の標識したF P R L 1リガンドを添加し、同時に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のF P R L 1リ

20

25

5 ガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0～50℃、望ましくは約4～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10 F P R L 1 リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物スクリーニングする上記のd)～e)の方法を実施するためには、例えば、F P R L 1を介する細胞刺激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

15 具体的には、まず、本発明のF P R L 1を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸、cAMPなど)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

20 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なF P R L 1を発現した細胞が必要である。本発明のF P R L 1を発現した細胞としては、天然型の本発明のF P R L 1を有する細胞株、上記の組換え型F P R L 1を発現した細胞株などが望ましい。

25 試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であって

もよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩として、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

また、試験化合物としては、本発明のF P R L 1の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。本発明のF P R L 1の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

F P R L 1 リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のF P R L 1、本発明のF P R L 1を含有する細胞、または本発明のF P R L 1を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

20 a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

25 b) F P R L 1 標品

本発明のF P R L 1を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

c) 標識F P R L 1 リガンド

市販の[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したF P R L 1

リガンド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。

d) FPRL1リガンド標準液

- 5 FPRL1リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- 10 a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のFPRL1発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

b) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl加えた後、標識FPRL1リガンドを5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} MのFPRL1リガンドを5 μl加えておく。

- 15 c) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識FPRL1リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

d) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

20
$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

- 25 FPRL1に対するアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記a)～c)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、FPRL1リガンドと本発明のFPRL1との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した細胞刺激活

性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のF P R L 1に対するアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明のF P R L 1に対するアンタゴニストである。

- 5 (ii) (a) 試験化合物を本発明のF P R L 1を含有する細胞に接触させ、上記した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のF P R L 1に対するアゴニストである。

- 10 (b) 本発明のF P R L 1を活性化する化合物（例えば、リガンド）を本発明のF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のF P R L 1を活性化する化合物および試験化合物を本発明のF P R L 1を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のF P R L 1を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明のF P R L 1を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させる化合物またはその塩は本発明のF P R L 1に対するアンタゴニストである。

- 15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合性またはシグナル伝達を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、(イ) F P R L 1を介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明のF P R L 1に対するアゴニスト）またはその塩、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のF P R L 1に対するアンタゴニスト）またはその塩、(ハ) F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を増強する化合物またはその塩、あるいは(ニ) F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を減少させる化合物またはその塩である。
- 20

- 25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例

えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 5 本発明のF P R L 1に対するアゴニストは、F P R L 1リガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、F P R L 1リガンドが有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

- 10 本発明のF P R L 1に対するアンタゴニストは、F P R L 1リガンドが有する生理活性を抑制することができるので、F P R L 1リガンドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を増強する化合物は、F P R L 1リガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 15 F P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を減少させる化合物は、F P R L 1リガンドが有する生理活性を減少させるためのF P R L 1リガンドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20 具体的には、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、特にアゴニストまたはF P R L 1リガンドと本発明のF P R L 1との結合力を増強する化合物またはその塩は、例えば、
25 低毒性で安全な細胞遊走刺激剤（あるいは細胞遊走促進剤）、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症

性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全の予防・治療剤として使用することができる。

一方、上記スクリーニング方法で得られるアンタゴニストまたはF P R L 1 リガンドと本発明のF P R L 1 との結合力を減少させる化合物またはその塩は、細胞遊走抑制剤として、さらには、本発明のF P R L 1 の発現過多に起因する疾患（例えば、感染症など）の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

また、上記スクリーニング方法で得られるアンタゴニストまたはF P R L 1 リガンドと本発明のF P R L 1 との結合力を減少させる化合物またはその塩は、例えば、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、

免疫不全などの予防・治療剤としても使用することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 5 例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、
- 10 結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性
- 15 セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、
- 20 例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。
- 25

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき本発明の F P R L 1 に対するアゴニストを約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与
- 15 対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、炎症患者（体重 60 kg として）においては、一日につき本発明の F P R L 1 に対するアゴニストを約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たり
- 20 りに換算した量を投与することができる。

（6）細胞膜における本発明の F P R L 1 またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬

- 本発明の抗体は、本発明の F P R L 1 を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明の F P R L 1 の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

（i）非ヒト哺乳動物の a）血液、b）特定の臓器、c）臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の F P R L 1 を定量することによる、細胞膜における本発明の F P R

L 1 の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(ii) 本発明の F P R L 1 を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜面分を単離し、細胞膜面分に含まれる本発明の F P R L 1 を定量することによる、細胞膜における本発明の F P R L 1 の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明の F P R L 1 の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明の F P R L 1 を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明の F P R L 1 の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜面分に含まれる本発明の F P R L 1 の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例えば、免疫調節薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトン X 1 0 0 TM、ツイーン 2 0 TM など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜面分を得る。

細胞膜面分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細

胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したF P R L 1と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のF P R L 1は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウェスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、ウェスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のF P R L 1を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のF P R L 1を定量することができる。

細胞膜における本発明のF P R L 1の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分～3日後、好ましくは1時間～2日後、より好ましくは1時間～24時間後）、細胞膜における本発明のF P R L 1の量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日～7日後、好ましくは1日～3日後、より好ましくは2

日～3日後)、細胞膜における本発明のF P R L 1の量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のF P R L 1の確認は具体的には以下のようにして行なう。

- 5 (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例えば、免疫調節薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のF P R L 1の量を確認する
10 ことができる。

15 (iv) 本発明のF P R L 1を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 20 試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 25 試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞

膜における本発明のF P R L 1の量を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、（イ）細胞膜における本発明のF P R L 1の量を増加させることにより、F P R L 1を介する細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩、（ロ）細胞膜における本発明のF P R L 1の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

細胞膜における本発明のF P R L 1の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、本発明のF P R L 1の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの低毒性で、安全な医薬として使用することができる。具体的には、該化合物またはその塩は、例えば、細胞遊走刺激剤（あるいは細胞遊走促進剤）、抗炎症剤として、さらには、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease

- ）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全の予防・治療剤として使用することができる。

- 一方、細胞膜における本発明のF P R L 1の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、例えば、細胞遊走抑制剤として、さらには本発明のF P R L 1の発現過多に起因する疾患（例えば、感染症など）に対する安全で低毒性な予防・治療剤として使用することができる。

- また、細胞膜における本発明のF P R L 1の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、例えば、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤としても使用することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくははそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ

カインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、炎症患者(体重60 kgとして)においては、一日につき本発明のF P R L 1の量を増加させる化合物またはその塩を約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、炎症患者(体重60 kgとして)においては、一日につき本発明のF P R L 1の量を増加させる化合物またはその塩を約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60 kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 10
- 15

(7) 本発明のF P R L 1に対する抗体を含有してなる医薬

- 20 本発明のF P R L 1に対する抗体の中和活性とは、該F P R L 1の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該F P R L 1の関与するシグナル伝達、例えば、該F P R L 1を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C a ²⁺遊離、細胞内c AMP生成、細胞内c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o sの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性、細胞遊走刺激活性(あるいは細胞遊走促進活性)など、特に細胞内c AMP生成抑制活性、細胞遊走刺激活性(あるいは細胞遊走促進活性))を不活性化することができる。
- 25

したがって、本発明のF P R L 1に対する抗体(例、中和抗体)は、細胞遊

走抑制剤、F P R L 1 の過剰発現やF P R L 1 リガンド過多などに起因する疾患（例えば、感染症など）の予防・治療剤などの低毒性で、安全な医薬として用いることができる。

- また、本発明のF P R L 1 に対する抗体は、例えば、抗炎症剤として、さら
- 5 には、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、
- 10 感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤としても
- 15 使用することができる。
- 20 上記予防・治療剤は、前記した本発明のF P R L 1 または本発明のF P R L 1 に対するアンタゴニストを含有する医薬と同様にして製造し、使用することができる。

（８）本発明のアンチセンスDNAまたはs i RNAを含有してなる医薬

- 25 本発明のアンチセンスDNAまたはs i RNAは、例えば、細胞遊走抑制剤、F P R L 1 の過剰発現やF P R L 1 リガンド過多などに起因する疾患（例えば、感染症など）の予防・治療剤などの低毒性で、安全な医薬として用いることができる。

また、本発明のアンチセンスDNAまたはs i RNAは、例えば、抗炎症剤

として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病 (Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害 (例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、エイズ脳症)、髄膜炎、糖尿病、関節炎 (例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎)、毒血症 (例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群)、炎症性腸疾患 (例、クローン病 (Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎)、炎症性肺疾患 (例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核)、あるいは悪液質 (例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群 (エイズ) による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染 (例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤としても使用することができる。

例えば、該アンチセンスDNAまたはsiRNAを用いる場合、該アンチセンスDNAまたはsiRNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAまたはsiRNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(9) 本発明のDNA導入動物の作製

本発明は、外来性の本発明のDNA (以下、本発明の外来性DNAと略記する) またはその変異DNA (本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある

)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

〔1〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

〔2〕非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕記載の動物、

5 〔3〕ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第〔2〕記載の動物、および

〔4〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその
10 始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作
15 出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

20 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、B
25 DF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDN

Aではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 5 該異常DNAとしては、異常な本発明のFPRL1を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のFPRL1の機能を抑制するFPRL1を発現させるDNAなどが用いられる。

- 10 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本
15 発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

- 20 本発明のFPRL1の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

- 25 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、イン

スリン I I、ウロプラキン I I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチン K 1, K 10 および K 14、コラーゲン I 型および I I 型、サイクリック AMP 依存蛋白質キナーゼ β I サブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般に Tie 2 と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および I I A、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原 (H-2 L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。

なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスの SV 40 ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の F P R L 1 の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の

肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なF P R L 1の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

10 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

20 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

25 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のF P R L 1の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、
5 本発明のF P R L 1の機能亢進症や、本発明のF P R L 1が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明のF P R L 1の増加症状を有することから、本発明のF P R L 1に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

10 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。
15 受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その
20 胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のF P R L 1の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のF P R L 1の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。
25

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のF P R L 1の機能不活性型不応症における本発明の異常F P R L 1による正常F P R L 1の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

- 5 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明のF P R L 1の増加症状を有することから、本発明のF P R L 1またはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 10 ①組織培養のための細胞源としての使用、
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたF P R L 1組織を分析することによる、本発明のF P R L 1により特異的に発現あるいは活性化するF P R L 1との関連性についての解析、
15 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
⑤本発明の変異F P R L 1を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- 20 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のF P R L 1の機能不活性型不応症などを含む、本発明のF P R L 1に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のF P R L 1に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- 25 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のF P R L 1産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどがで

き、本発明のF P R L 1 およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のF P R L 1 の機能不活性型不応症を含む、本発明のF P R L 1 に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のF P R L 1 が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(10) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- [2] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第[1]項記載の胚幹細胞、
- 15 [3] ネオマイシン耐性である第[1]項記載の胚幹細胞、
- [4] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]項記載の胚幹細胞、
- [5] ゲッ歯動物がマウスである第[4]項記載の胚幹細胞、
- [6] 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- [7] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ
- 20 遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第[6]項記載の非ヒト哺乳動物、
- [8] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[6]項記載の非ヒト哺乳動物、
- [9] ゲッ歯動物がマウスである第[8]項記載の非ヒト哺乳動物、および
- 25 [10] 第[7]項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの

発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のF P R L 1の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のF P R L 1の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、E S細胞と略記する）をいう。

5 非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コードンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

10 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化E S細胞または本発明のノックアウトE S細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはl a c Z（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、c a t（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたE S細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトE S細胞を選別することにより得ることができる。

25 また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のE S細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知

- EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのE S細胞の場合、現在、一般的には129系のE S細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなE S細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたE S細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、E S細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

- また、雌雄いずれのE S細胞を用いてもよいが、通常雄のE S細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

- E S細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のE S細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるE S細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

- また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるE S細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mMEDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mMEDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり[M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のFPRL1または本発明のFPRL1の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色

体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

5 本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲティングベクター上のDNA配列と、ターゲティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

10

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のF P R L 1のヘテロ発現不全個体であり、本発明のF P R L 1のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のF P R L 1のホモ発現不全個体を得ることができる。

15

20

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

25

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、

該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のF P R L 1により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のF P R L 1の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(10a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用

いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、例えば、該試験動物の炎症症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、例えば、細胞遊走刺激剤（あるいは細胞遊走促進剤）、抗炎症剤として、さらには本発明のF P R L 1の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例えば、喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（A.L.S）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシ

ス、肺結核)、あるいは悪液質(例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群(エイズ)による悪液質)、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染(例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染)、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全など)に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタン

15 スルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のF P R L 1とF P R L 1リガンドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

20 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に炎症患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物またはその塩を注射剤の形で通常、炎症患者(体重60kgとして)に投与する場

25

合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり
に換算した量を投与することができる。

- 5 (10b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング
10 グ方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが
15 用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 20 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のFPRL1をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の
25 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のFPRL1の発現する組織で、本発明のFPRL1の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド(X-gal)のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のFPRL1の

動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明の F P R L 1 欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (P B S) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または 37℃ 付近で、約 30 分ないし 1 時間反応させた後、組織標本を 1 mM EDTA/PBS 溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZ をコードする mRNA を検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該スクリーニング方法で得られた化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明の F P R L 1 の発現を促進し、該 F P R L 1 の機能を促進することができるので、例えば、本発明の F P R L 1 の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの低毒性で、安全な医薬として使用することができる。具体的には、該化合物またはその塩は、例えば、細胞遊走刺激剤 (あるいは細胞遊走促進剤)、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病 (Addison's disease)、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害 (例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、エイズ脳症)、髄膜炎、糖尿病、関節炎 (例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎)、毒血症 (例、敗

- 血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全の予防・治療剤として使用することができる。
- 5
- 10 一方、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のF P R L 1の発現を阻害し、該F P R L 1の機能を阻害することができるので、例えば、細胞遊走抑制剤として、さらには本発明のF P R L 1の発現過多に関連する疾患（例えば、感染症など）などの予防・治療剤などの低毒性で、安全な医薬として有用である。
- 15 また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、抗炎症剤として、さらには、例えば喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病（Addison's disease）、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、中枢神経障害（例えば、脳出血及び脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症）、髄膜炎、糖尿病、関節炎（例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎）、毒血症（例、敗血症、敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性敗血症、トキシックショック症候群）、炎症性腸疾患（例、クローン病（Crohn's disease
- 20
- 25 ））、潰瘍性大腸炎）、炎症性肺疾患（例、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核）、あるいは悪液質（例、感染による悪液質、癌性悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）による悪液質）、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染（例、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染）、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不

全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全などの予防・治療剤としても使用することができる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のF P R L 1またはその塩とF P R L 1リガンドとの結合性を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に炎症患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常、炎症患者（体重60kgとして）に
20 投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 25 このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のF P R L 1のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に

注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのF P R L 1を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のF P R L 1そのものの体内
5 での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I U P A C - I U B Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。また
10 アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	D N A	: デオキシリボ核酸
	c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
15	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	R N A	: リボ核酸
	m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
20	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
25	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン

	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
5	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
10	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
15	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する
20	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
25	また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表 記 する。	
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル

	B z l	: ベンジル
	C l ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
5	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
10	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
15	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：1

本発明のブタ型F P R L 1リガンド（P 3）のアミノ酸配列を示す。

20 配列番号：2

ヒト由来F P R L 1のアミノ酸配列を示す。

配列番号：3

ヒト由来F P R L 1をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：4

25 ラット由来F P R L 1のアミノ酸配列を示す。

配列番号：5

ラット由来F P R L 1をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：6

マウス由来F P R L 2のアミノ酸配列を示す。

配列番号： 7

マウス由来F P R L 2をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号： 8

参考例 1 で用いたプライマー 1 の塩基配列を示す。

5 配列番号： 9

参考例 1 で用いたプライマー 2 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 0

実施例 5 で用いたプライマー 3 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 1

10 実施例 5 で用いたプライマー 4 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 2

実施例 5 で用いたプライマー 5 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 3

実施例 5 で用いたプライマー 6 の塩基配列を示す。

15 配列番号： 1 4

実施例 5 で用いたプライマー 7 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 5

実施例 5 で用いたプライマー 8 の塩基配列を示す。

配列番号： 1 6

20 本発明のヒト型F P R L 1 リガンド (P 3) のアミノ酸配列を示す。

配列番号： 1 7

本発明のブタ型F P R L 1 リガンド (P 1) A のアミノ酸配列を示す。

配列番号： 1 8

本発明のブタ型F P R L 1 リガンド (P 1) B のアミノ酸配列を示す。

25 配列番号： 1 9

本発明のヒト型F P R L 1 リガンド (P 1) A のアミノ酸配列を示す。

配列番号： 2 0

本発明のヒト型F P R L 1 リガンド (P 1) B のアミノ酸配列を示す。

配列番号： 2 1

本発明のブタ型FPRL1リガンド(P4)のアミノ酸配列を示す。

配列番号：22

本発明のヒト型FPRL1リガンド(P4)のアミノ酸配列を示す。

配列番号：23

- 5 本発明のブタ型FPRL1リガンド(P2)のアミノ酸配列を示す。

配列番号：24

本発明のヒト型FPRL1リガンド(P2)のアミノ酸配列を示す。

- 後述の実施例5で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pUC18-rFPRL1は2003年1月10日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8274として寄託されている。
- 10

実施例

- 以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。
- 15

実施例1 ヒトFPRL1-GFPを発現させたCHO細胞における、フォルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のブタ胃抽出液フラクションによる抑制作用

20

- ヒトFPRL1-GFPを発現させたCHO細胞をアッセイ用培地(HBS S (GibcoBRL)に0.1%ウシ血清アルブミン、および、0.2mM IBMXを添加したもの)にて洗浄した後、37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈した各濃度のブタ胃抽出液フラクション(0.05 g/well、0.5 g/well)を添加し、その後フォルスコリン1μMとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。培養上清を捨てて、cAMP screen kit(アプライドバイオシステムズ社)のプロトコールに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー(ARVO sx マルチラベルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。
- 25

その結果、ベクターのみを導入したCHO細胞(mock)に比べ、FPRL1-GFP遺伝子を導入したCHO細胞特異的に、フォルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のブタ胃抽出液フラクション(0.05g/wellおよび0.5g/well)による用量依存的かつ特異的な減少が検出された(図1)。

実施例2 ブタ胃からの内因性FPRL1リガンドP3の精製

実施例1で見出されたヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性をブタ胃のペプチド粗画分から精製した。

まず、ブタ胃4kgをミリQ水8L中で煮沸し、酢酸を1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸(TFA)を0.05%となるように加え、C18カラム(Prep C18 125Å; Waters)にアプライした。カラムに結合したペプチドを0.5%TFAを含む30、50%アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30%アセトニトリル画分を二倍量の20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)で希釈し、イオン交換カラム HiPrep CM-Sephacrose FF (Pharmacia) にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)中の0~1.0M NaClの濃度勾配で溶出した。もっとも多くヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性が含まれていた0.1~0.2M NaCl画分に3倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に0.1%となるようTFAを加え、逆相HPLCカラム SOURCE 15RPC 20ml (Pharmacia) にてさらなる分離を行った。RESOURCE RPCの分離は10~30%アセトニトリルの濃度勾配で行い、ヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性は、複数のピークに分かれて溶出された。これら活性ピークのうちアセトニトリル濃度26%で溶出される画分を、YMC-Pack Pro C18カラムにて分離した。YMC-Pack Pro C18カラムの分離は22~26%アセトニトリルの濃度勾配で行い、活性画分はアセト

ニトリル濃度24%で溶出された。さらに、この活性画分を10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)中での0~0.5M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK gel CM-SW (トソー) で分離した。主たるヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性は、NaCl濃度0.2Mで溶出された。CM-2SWカラムの活性画分に0.1%となるようTFAを加え、20~22%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラムdiphenyl 219 TP52 (Vydac) で最終精製し、ヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性と一致する単一のピークを得た(図2)。

実施例3 プタ内因性FPRL1リガンドP3の質量分析

実施例2で生成されたプタ内因性FPRL1リガンド P3フラクションを、まず、Voyager-DE PRO (ABI) にてマトリックスアシスティッドレーザーデソープションイオン化飛行時間型質量分析したところ(図3)、 m/z 1724.8、1741.6、1772.7が出現した。

次に、FPRL1リガンドP3フラクションをQ-ToF Ultima API (Micromass) にてエレクトロスプレーイオン化質量分析し、同機種付属の解析ソフトMassLynxで解析した。多価イオンが混在する生データ(図4)では主として3価イオン m/z 575.30、580.64が出現し、これらをMassLynx機能の一つ“MaxEnt3”処理にて一価イオンに変換したところ(データ示さず) m/z 1723.88、 m/z 1739.89を得た。これらの結果から、FPRL1リガンドの分子関連イオン($M+H^+$)は m/z 1723.88で、 m/z 1739.89は m/z 1723.88の酸化体と考えられた。

次に、Q-ToF Ultima APIにてMS/MS測定した。 m/z 575.3、580.6を親イオンにして測定したところ、両スペクトルで、多数のフラグメントイオンが共通して出現した。解析のしやすさから酸化体の3価のイオン m/z 580.6を親イオンにして測定したスペクトルをMaxEnt3処理したもので(図5)を配列解析した。この結果を元にデータベ

- ース検索して、本物質の配列を、Nホルミル化されたブタ *cytochrome c oxidase* のN末端13残基であると推定した。配列は以下の通り：CHO-Met (O) -Phe-Val-Asn-Arg-Trp-Leu-Tyr-Ser-Thr-Asn-His-Lys。非酸化体は、本推定
- 5 構造の1位Metが酸化されていないものと推定される。

実施例4 ブタ内因性FPRL1リガンドP3の内部配列分析

- 実施例3で推定されたブタ内因性FPRL1リガンドP3の構造を確認するために、トリプシン消化後N末端配列分析した(図6)。その結果、推定構造の5位ArgのC末端側で切断されて生成する断片ペプチドの配列を確認する
- 10 ことができた。

参考例1 マウス脾臓由来FPRL2をコードするcDNAのクローニングと発現ベクターの構築

- マウス脾臓cDNA (Marathon-Ready™ cDNA; Clontech社)を鋳型として、マウスFPRL2の配列情報 (Accession #071180; NCBI)をもとに設計した2個のプライマー、プライマー1 (配列番号：8) 及びプライマー2 (配列番号：9) を用いてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造) を使い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2分の伸長反応を行なった。反応後、
- 15 増幅産物を制限酵素Sal I及びXba Iで切断した後、プラスミドベクターpAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。その塩基配列を解析した結果、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるマウスFPRL2をコードするcDNA配列 (配列番号：7) を得た。

- #### 実施例5 ラット脾臓由来FPRL1をコードするcDNAのクローニングとその塩基配列の決定及び発現ベクターの構築
- 25

ラット脾臓mRNAからMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社) を用いてcDNAを合成し、その末端にアダプターを付加した。これを鋳型として、2個のプライマー、プライマー3 (配列番号：10) 及びプライマー4 (配列番号：11) を用いてPC

Rを行なった。PCRにはAdvantage 2 Polymerase mix (Clontech社)を用い、①96℃・1分、②96℃・10秒、72℃・2分を5回、③96℃・10秒、70℃・2分を5回、④96℃・10秒、68℃・2分を25回の後、⑤72℃・5分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1TOPO (Invitrogen社)に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造)に導入してクローニングした。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。この配列情報をもとに2個のプライマー、プライマー5 (配列番号: 12) 及びプライマー6 (配列番号: 13) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社)の処方に従ってそれぞれ5' -RACE及び3' -RACEを行なった。PCRは上述のものと同様に行ない、反応後増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1TOPO (Invitrogen社)に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造)に導入してクローニングした。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。これらの配列情報からさらに2個のプライマー、プライマー7 (配列番号: 14) 及びプライマー8 (配列番号: 15) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造)を用い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物を制限酵素Sal I及びXba Iで切断した後、プラスミドベクターpAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。これを制限酵素Sal I及びNhe Iで切断して挿入断片を切出し、プラスミドベクターpUC119に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G

蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:5)を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:4)を含有する新規タンパク質をラットFPRL1と命名した。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌(*Escherichia coli*) JM109/pUC119-rFPRL1と命名した。

実施例6 ラット脾臓由来FPRL1をコードするcDNAを含有するプラスミドの作製

実施例5で得られた発現ベクターを制限酵素SalI及びNheIで切断して挿入断片を切出し、プラスミドベクターpUC18に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、実施例5と同様に配列番号:4で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:5)であることが確認できた。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌(*Escherichia coli*) JM109/pUC18-rFPRL1と命名した。

実施例7 ブタ胃からの内因性FPRL1リガンドP1の精製

実施例1で見出されたヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性をブタ胃のペプチド粗画分から精製した。

まず、ブタ胃12kgをミリQ水8L中で煮沸し、酢酸を1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸(TFA)を0.05%となるように加え、C18カラム(Prep C18 125Å; Waters)にアプライした。カラムに結合したペプチドを0.5%TFAを含む30、50%アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30%アセトニトリル画分を二倍量の20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)で希釈し、イオン交換カラムHiPrep CM-Sephrose FF(Pharmacia)にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム(pH4.7)中の0~1.0M NaClの濃度勾配で溶出した。もっとも多くヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性が含まれていた0.1~0.2M NaCl画分に3倍量

- の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に0.1%となるようTFAを加え、逆相HPLCカラムSOURCE 15RPC 20ml (Pharmacia) にてさらなる分離を行った。SOURCE 15RPCの分離は10~30%アセトニトリルの濃度勾配で行い、ヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性は、複数のピークに分かれて溶出された。これら活性ピークのうちアセトニトリル濃度22%で溶出される画分を、YMC-Pack Pro C18カラムにて分離した。YMC-Pack Pro C18カラムの分離は18~22%アセトニトリルの濃度勾配で行い、活性画分はアセトニトリル濃度21%で溶出された。さらに、この活性画分を10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム (pH4.7) 中での0.05~0.3M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラムTSK gel CM-SW (トソー) で分離した。主たるヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性は、NaCl濃度0.17Mで溶出された。CM-2SWカラムの活性画分に0.1%となるようTFAを加え、15~17%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラムdiphenyl 219TP5215 (Vydac) で分離した。16.5%アセトニトリル濃度で溶出された活性画分を μ RPC C2/C18 SC2.1/10 (アマシャムバイオサイエンス) で最終精製し、ヒト型FPRL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性と一致する単一のピークを得た (図7)。

実施例8 ブタ内因性FPRL1リガンドP1の質量分析

- 実施例7で精製されたブタ内因性FPRL1リガンド P1フラクションを、まず、Voyager DE Pro (ABI) にてマトリックスアシスティッドレーザーデソーブションイオン化飛行時間型質量分析したところ (図8)、 m/z 1921、1937、1952が出現した。

次に、FPRL1リガンドP1をQ-ToF Ultima API (Micromass) にてエレクトロスプレーイオン化質量分析し、同機種付属の解析ソフトMassLynxで解析した。多価イオンが混在する生データ (図

9および図10)では $M+2H^{2+}$ (m/z 960.52)、 $M+3H^{3+}$ (m/z 640.99)、 $M+4H^{4+}$ (m/z 481.00)出現し、これらを装置付属のソフトMaxEnt3処理にて一価イオンに変換したところ m/z 1920.0を得た。

- 5 次に、Q-ToF Ultima APIにてMS/MS測定した。 $M+2H^{2+}$ 、 $M+4H^{4+}$ を親イオンにして測定したスペクトルをMaxEnt3処理したもので配列を解析した(図11および図12)。この結果を元にデータベース検索して、本物質の配列を、Nホルミル化されたブタcytochrome bのN末端ペプチドと推定した。配列は以下の通りである。

- 10 CHO-Met-Thr-Asn-Ile-Arg-Lys-Ser-His-Pro-Leu-Met-Lys-Ile-Ile-Asn (配列番号: 17)。

実施例9 ブタ内因性FPR L1リガンド P1の内部配列分析

- 実施例8で推定されたブタ内因性FPR L1リガンド P1の構造を確認するために、N-ホルミル基を切断する処理(25% TFA、55℃、2時間)の後N末端配列分析した(図13)。その結果、推定構造1位Met以降の9残基の配列を確認することができた。
- 15

実施例10 ブタ胃からの内因性FPR L1リガンドP1と化学合成標品の活性比較

- 実施例7で精製されたブタ内因性FPR L1リガンドP1とその構造解析より推測されたN末端がホルミル化されたブタ型ブタ型Cytochrome B N末端15アミノ酸を含有する16アミノ酸ペプチド(formyl-MTNIRKSHPLMKIINN、配列番号: 18)の活性をヒト型FPR L1発現CHO細胞における細胞内cAMP産生抑制活性を指標に比較した(図14)。その結果、最終精製標品と合成品は同等の活性を示した。
- 20

- 25 実施例11 ブタ胃からの内因性FPR L1リガンドP4の精製

実施例1で見出されたヒト型FPR L1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性をブタ胃のペプチド粗画分から精製した。

まず、ブタ胃8kgをミリQ水16L中で煮沸し、酢酸を1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。

上清にトリフルオロ酢酸 (TFA) を 0.05% となるように加え、C18 カラム (Prep C18 125 Å; Waters) にアプライした。カラムに結合したペプチドを 0.5% TFA を含む 10、30、50% アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30% アセトニトリル画分を二倍量の 20 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.7) で希釈し、イオン交換カラム HiPrep CM-Sephrose FF (Pharmacia) にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを 10% アセトニトリルを含む 20 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.7) 中の 0~1.0 M NaCl の濃度勾配で溶出した。もっとも多くヒト型 FPRL1-GFP 発現 CHO 細胞特異的な細胞内 cAMP 産生抑制活性が含まれていた 0.1~0.2 M NaCl 画分に 3 倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に 0.1% となるよう TFA を加え、逆相 HPLC カラム SOURCE 15RPC 20ml (Pharmacia) にてさらなる分離を行った。RESOURCE RPC の分離は 10~30% アセトニトリルの濃度勾配で行い、ヒト型 FPRL1-GFP 発現 CHO 細胞特異的な細胞内 cAMP 産生抑制活性は、複数のピークに分かれて溶出された。これら活性ピークのうちアセトニトリル濃度 28% で溶出される画分を、YMC-Pack Pro C18 カラムにて分離した。YMC-Pack Pro C18 カラムの分離は 24~28% アセトニトリルの濃度勾配で行い、活性画分はアセトニトリル濃度 26% で溶出された。さらに、この活性画分を 10% アセトニトリルを含む 20 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.7) 中での 0.05~0.3 M NaCl の濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK gel CM-SW (トソー) で分離した。主たるヒト型 FPRL1-GFP 発現 CHO 細胞特異的な細胞内 cAMP 産生抑制活性は、NaCl 濃度 0.18 M で溶出された。CM-2 SW カラムの活性画分に 0.1% となるよう TFA を加え、20~22% アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラム diphenyl 219TP5215 (Vydac) で最終精製し、ヒト型 FPRL1-GFP 発現 CHO 細胞特異的な細胞内 cAMP 産生抑制活性と一致する単一のピークを得た (図 15)。

実施例 12 ブタ内因性FPRL1リガンドP4の質量分析

実施例 11 で生成されたブタ内因性FPRL1リガンド P4フラクションをQ-ToF Ultima API (Micromass) にてエレクトロスプレイイオン化質量分析し、同機種付属の解析ソフトMassLynxで解析した。多価イオンが混在する生データでは主として3価イオン (図16) した。モノアイソトープイオンは m/z 660. 2485。加えて酸化された分子由来のイオンも出現した。

次に、Q-ToF Ultima API にてMS/MS測定した。酸化体の3価イオン665. 60、2価イオン m/z 989. 88を親イオンにして測定したスペクトルをMaxEnt 3処理したもので配列を解析した (図17および図18)。解析の結果推定された配列は、Nホルミル化されたブタ cytochrome c oxidase のN末端15アミノ酸残基の配列と一致した。配列は以下の通り: formylMet-Phe-Val-Asn-Arg-Trp-Leu-Tyr-Ser-Thr-Asn-His-Lys-Asp-Ile-X (配列番号: 21-X。Xは未確定構造)。

実施例 13 ブタ内因性FPRL1リガンド P4の内部配列分析

実施例 12 で推定されたブタ内因性FPRL1リガンド P4の構造を確認するために、ブタ内因性FPRL1リガンドP4を、N-ホルミル基を除去する加水分解条件で処理後、N末端配列分析した。すなわち、FPRL1リガンドP4フラクション40、35 μ l を採取し、SAVANTにより液量を減らし、100 μ l 25% TFA-水を添加して55℃にて2時間反応させ、SAVANTで液量を減らした後全量をN末端配列分析した (図19)。その結果、推定構造の1位Met以下13アミノ酸残基の配列を確認することができた。

実施例 14 ヒトFPRL1競合阻害試験

ブタFPRLリガンドP3 (pfCYOX-1 (1-13)) およびヒトFPRLリガンドP3 (hfCYOX-1 (1-13)) (株式会社 ペプチド研究所にて合成) を用いラクトペルオキシダーゼ法によって以下のように¹²⁵I標識化したものを調製した。ペプチドの0.1mM 水溶液20 μ l に対し、0.1M HEPES-NaOH/pH7.0 に10 μ g/mlの濃度で溶解したラクトペルオキシダーゼ (Sigma社) を20 μ l、

Iodine-125 (Amersham社、IMS-30、74MBq) を20 μ l、30%過酸化水素水 (和光純薬) を6000倍に希釈した水溶液を20 μ lを加え、ボルテックスミキサーで混合した後、室温で10分間インキュベートした。0.1% TFAを含有する蒸留水を600 μ l 5 添加して反応を停止した後、TSKgel ODS-80TM CTR 4.6 x 100mm カラムを用いた逆相HPLCによって分離し、反応によって生成した標識体のピーク部分を分取した。等量のアッセイバッファー (50mM Tris-HCl/pH7.5, 5mM EDTA, 0.5mM PMSF, 20 μ g/ml leupeptin, 0.1 μ g/ml pepstatin A, 4 μ g/ml E-64 (株式会社 ペプチド研究所), 0.1% ウシ血清アルブミン) と混合し、使用時まで-30℃にて保存した。

ヒトF P R L 1 発現C H O細胞 (N o. 8) を培養し、5mM EDTA含有PBSを用いて培養容器より細胞を回収した後、ウシ血清アルブミンを含有しない前出のアッセイバッファーに懸濁した。ポリトロンホモジナイザー (キネマティカ社) を用いて18,000rpm、40秒のホモジナイズを3回行ない、遠心分離 (1000 \times g、4℃、10 10 分間) した後の上清を回収した。沈殿に対して同じ操作を再び行ない、それぞれの上清を集めた後、100,000 \times g、4℃、1時間の遠心を行ない、沈殿 (膜画分) を 15 回収した。膜画分は少量のバッファーに再懸濁した後、テフロンホモジナイザーを用いて均一化し、使用時まで-80℃にて保存した。

競合阻害試験は以下の条件にて実施した。ポリプロピレン製の96ウェルプレートに0.25 μ gの膜画分、終濃度25pMの¹²⁵I標識化合物、被検体、アッセイバッ 20 ファーを加えた200 μ lの溶液を調製し、室温で1時間インキュベートした。非特異結合量の測定は検体の代わりに1 μ Mの非標識化合物を加えたウェルを用いて行なった。インキュベート終了後に96ウェル対応のセルハーベスター (パッカード社) およびポリエチレンイミン (和光純薬) で処理したフィルターユニット (GF/C、パッカード社) を用いて分離を行ない、フィルターに膜画分を捕集した。フィルターを十分に乾燥させた後、Microcinti 0 (パッカード社) を添加し、トップカ 25 ウント (パッカード社) を用いてフィルターに膜画分と共に捕集された標識体の量を測定した。それぞれの測定値より非特異結合量を引いた後、検体を添加しないウェル (全結合量) に対して検体の添加によって減少した結合量の割合 (阻害率) を算出し、さらに各検体の用量-阻害曲線からIC₅₀値を算出した (表1)。

[表1]

試 料	I C ₅₀ (nM)
p f C Y O X - 1 (1 - 1 3)	0. 1 5 ± 0. 0 1
h f C Y O X - 1 (1 - 1 3)	1. 1 ± 0. 0 5

実施例 15 プタ胃からの内因性 F P R 1 リガンド P 2 の精製

実施例 1 で見出されたヒト型 F P R L 1 - G F P 発現 C H O 細胞特異的な細胞内 c A M P 産生抑制活性をプタ胃のペプチド粗画分から精製した。

- まず、プタ胃 1 4 k g をミリ Q 水 2 8 L 中で煮沸し、酢酸を 1 M となるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸 (T F A) を 0. 0 5 % となるように加え、C 1 8 カラム (P r e p C 1 8 1 2 5 Å ; W a t e r s) にアプライした。カラムに結合したペプチドを 0. 5 % T F A を含む 1 0、3 0、5 0 % アセトニトリルでステップワイズに溶出した。3 0 % アセトニトリル画分を二倍量の 2 0 m M 酢酸アンモニウム (p H 4. 7) で希釈し、イオン交換カラム H i P r e p C M - S e p h a r o s e F F (P h a r m a c i a) にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを 1 0 % アセトニトリルを含む 2 0 m M 酢酸アンモニウム (p H 4. 7) 中の 0 - 1. 0 M N a C l の濃度勾配で溶出した。もっとも多くヒト型 F P R L 1 - G F P 発現 C H O 細胞特異的な細胞内 c A M P 産生抑制活性が含まれていた 0. 1 - 0. 2 M N a C l 画分に 3 倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に 0. 1 % となるよう T F A を加え、逆相 H P L C カラム S O U R C E 1 5 R P C 2 0 m l (P h a r m a c i a) にてさらなる分離を行った。R E S O U R C E R P C の分離は 1 0 - 3 0 % アセトニトリルの濃度勾配で行い、ヒト型 F P R L 1 - G F P 発現 C H O 細胞特異的な細胞内 c A M P 産生抑制活性は、複数のピークに分かれて溶出された。これら活性ピークのうちアセトニトリル濃度 2 5 % で溶出される画分を、Y M C - P a c k P r o C 1 8 カラムにて分離した。Y M C - P a c k P r o C 1 8 カラムの分離は 2 0 - 2 6 % アセトニトリルの濃度勾配で行い、活性画分はアセトニトリル濃度 2 5 % で溶出された。さらに、この活性画分を 1 0 % アセトニトリルを含む 2 0 m M 酢酸アンモニウム (p H 4. 7) 中での 0.

0.5-0.3M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK
gel CM-SW (トソー) で分離した。主たるヒト型FPRL1-GFP
P発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性は、NaCl濃度0.
14Mで溶出された。CM-2SWカラムの活性画分に0.1%となるようT
5 FAを加え、20-24%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラムdi
phenyl 219TP5215 (Vydac) で最終精製し、ヒト型FP
RL1-GFP発現CHO細胞特異的な細胞内cAMP産生抑制活性と一致す
る単一のピークを120pmol得た(図20)。

実施例16 ブタ内因性FPRL1リガンドP2の質量分析

10 実施例15で精製されたブタ内因性FPRL1リガンドP2フラクションを、
Q-ToF Ultima API (Micromass) にてエレクトロス
プレイイオン化質量分析し、同機種付属の解析ソフトMassLynxで解析
した。図21に $M+3H^{3+}$ (モノアイソトープピーク値: m/z 719.3
8) を示す。次に、同質量分析機にてMS/MS測定した。 $M+2H^{2+}$ を親イ
15 オンにして測定したスペクトルをMaxEnt 3処理したもので配列解析した
(図22、-PLMKLLNNAF: -は、未決定アミノ酸を示す。LとIは
質量数は同じである。)。この結果を元にデータベース検索して、本物質の配
列を、Nホルミル化されたブタcytochrome bのN末端ペプチドと
推定した。質量分析結果とcytochrome bのアミノ酸配列を考え合
20 わせて、本標品の配列は以下のものと推定された。

CHO-Met-Thr-Asn-Ile-Arg-Lys-Ser-His
-Pro-Leu-Met-Lys-Ile-Ile-Asn-Asn-Al
a-Phe (配列番号: 23)。

本推定構造の $M+3H^{3+}$ モノアイソトープピーク値計算値は m/z 719.
25 39で、測定値(m/z 719.38)とよく一致している。

実施例17 ブタ内因性FPRL1リガンドP2の内部配列分析

実施例16で推定されたブタ内因性FPRL1リガンドP2の構造を確認す
るために、N-ホルミル基を切断する処理(25% TFA、55℃、2時間)
の後、以下の方法でN末端配列分析した。

FPRL1リガンドP2 HPLCフラクション

↓SAVANT

↓+100 μ l 25%TFA-DW

↓55 $^{\circ}$ C、2時間

5 ↓SAVANTで液量を減らした。

N末端配列分析 (ABI 491cLC)

その結果、推定構造1位Met以降の13残基の配列を確認することができた (図23)。

実施例18 CHO細胞に発現させたFPRL1-GFP融合タンパク質のホルミル化ペプチド (ブタFPRL1リガンドP3 (pfCYOX-1 (1-13)) またはヒトFPRL1リガンドP3 (hfCYOX-1 (1-13))) 添加による細胞内移行

ヒトFPRL1のC末端にGFP (Green Fluorescent Protein) を融合したタンパク質を安定的に発現させたCHO細胞株を、自体公知の方法により動物細胞用発現プラスミドを用いて樹立した。該タンパク質の細胞内移行の検定には増殖期にある該細胞を40000cells/ウェルの濃度で96穴プレート (Packard社、View-PlateTM-96, Black) に播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で一晩培養したものを用いた。まず、アッセイ用緩衝液 (HBSS (GibcoBRL) に0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を添加したもの) にてウェル内の該細胞を洗浄した後、被検試料を含む同アッセイ用緩衝液を各ウェルに100 μ lずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下で1時間培養した。その後、細胞固定液 (4%パラホルムアルデヒド含有PBS (Ca/Mgフリー)) を100 μ l/ウェル添加して室温下30分放置した。細胞固定液を除去し、Ca/MgフリーPBSで細胞を洗浄後、ラベル化溶液 (3.13 μ g/ml wheat germ agglutinin (Molecular Probes社 W-849)、5 μ g/ml Hoechst含有Ca/MgフリーPBS) を50 μ l/ウェル添加し、室温下20分放置した。ラベル化溶液を除去後、細胞をCa/MgフリーPBS (200 μ l/ウェル) で洗浄し、同液 (200 μ l/ウェル) へ置換した後、プレー

ト表面をシールして、直ちにCellomics ArrayScan System (Cellomics社) にて解析した。FPRL1-GFP融合タンパク質の細胞内局在性の評価は、同システムに添付のGPCR Signaling Assay Protocolに従って最適化し、well featureのパラメータの一つであるMemCytto Above Threshold (ウェル内の全細胞集団に対し、タンパク質の膜/細胞質局在比を表す一定のパラメータ値 (MemCytto Intensity Ratio) を超える細胞群の割合 (単位%)) で行った。

その結果、ホルミル化ペプチド (ブタFPRL1リガンドP3 (pfCYOX-1 (1-13))、ヒトFPRL1リガンドP3 (hfCYOX-1 (1-13))) を添加した場合、濃度依存的なFPRL1-GFPタンパク質の細胞膜から細胞質への移行、即ちインターナリゼーション誘導 (MemCytto Above Threshold値の低下) が認められた。

実施例19 FPRL1-GFP融合タンパク質発現CHO細胞に対するホルミル化ペプチド (ブタFPRL1リガンドP3 (pfCYOX-1 (1-13)) またはヒトFPRL1リガンドP3 (hfCYOX-1 (1-13))) の細胞遊走刺激活性

実施例18記載のFPRL1-GFP融合タンパク質発現CHO細胞を用いて、ホルミル化ペプチド刺激による該細胞の細胞遊走活性の有無を調べた。

検定には96穴型のディスポーザブルケモタキシスチャンバー (Chemotax-96、Neuro Probe社) を用いた。まず、チャンバーの各ボトムウェルに0.5% BSA含有DMEM (Invitrogen社) で希釈した被検試料を添加後、予め10 μ g/ml ウシフィブロネクチン (Yagai) で両面をコートしたポリカーボネート製フィルターを該チャンバーに装着し、被検試料に接触させた。次に、FPRL1-GFP融合タンパク質発現CHO細胞の懸濁液をフィルター上面の各96穴部位にドロップ状に置き、添付の蓋をかぶせた後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下で4時間培養した。この細胞懸濁液は、予め150cm²培養フラスコで培養していた増殖期の該CHO細胞をトリプシン/EDTA溶液を用いて剥離し、得られた細胞懸濁液を遠心して

- 細胞の沈殿を得、PBSで一回洗浄の後、0.5% BSA含有DMEM培地で 3.6×10^6 cells/mlの濃度に再懸濁したものを用いた。同チャンバーで該細胞を培養後、フィルター上面に存在する未遊走細胞を除去するとともに、フィルター下面に遊走してきた細胞をDiff-Quick（国際試薬）を用いて添付資料の手順に従いながら細胞の固定、染色を行った。フィルターは下面以外の洗浄を十分行った後、風乾させた。このフィルターについてマイクロプレートリーダーを用いて595nmにおける吸光度を測定した。その結果、ブタFPRL1リガンドP3（pfCYOX-1（1-13））およびヒトFPRL1リガンドP3（pfCYOX-1（1-13））がbell-shape状に濃度依存的な細胞遊走刺激活性を示した（図24）。

産業上の利用可能性

- 本発明のFPRL1リガンド、本発明のFPRL1、または本発明のFPRL1をコードするDNAは、例えば、抗炎症剤として使用することができる。
- 15 本発明のFPRL1リガンドとFPRL1とを用いることによって、FPRL1リガンドとFPRL1との結合性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

請求の範囲

1. N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：1 または配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア
5 ミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
2. N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：1で
表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなる請
求項1記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
3. N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：1または配
10 列番号：16で表されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のペプチド、そのア
ミドもしくはそのエステルまたはその塩。
4. N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：21または配
列番号：22で表されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のペプチド、その
アミドもしくはそのエステルまたはその塩。
- 15 5. N末端のメチオニン残基がホルミル化され、C末端のイソロイシン残基が
修飾されている配列番号：21または配列番号：22で表されるアミノ酸配列
からなる請求項1記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはそ
の塩。
6. N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：17
20 または配列番号：23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列からなるペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその
塩。
7. N末端のメチオニン残基がホルミル化されていてもよい、配列番号：17
で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列からなる
25 請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
8. N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：17、配列番
号：18、配列番号：19または配列番号：20で表されるアミノ酸配列から
なる請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。
9. N末端のメチオニン残基がホルミル化されている配列番号：23または配

列番号：24で表されるアミノ酸配列からなる請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

10. 請求項1記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

5 11. 請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

12. 細胞遊走刺激剤である請求項10または11記載の医薬。

13. 抗炎症剤である請求項10または11記載の医薬。

14. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である請求項10または11記載の医薬。

15 15. 請求項1記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

16. 請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

17. 請求項15記載の抗体を含有してなる診断剤。

18. 請求項16記載の抗体を含有してなる診断剤。

25 19. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血

- 症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である請求項 1
- 5 7 または 1 8 記載の診断剤。
- 2 0. 請求項 1 5 記載の抗体を含有してなる医薬。
- 2 1. 請求項 1 6 記載の抗体を含有してなる医薬。
- 2 2. 細胞遊走抑制剤である請求項 2 0 または 2 1 記載の医薬。
- 2 3. 感染症の予防・治療剤である請求項 2 0 または 2 1 記載の医薬。
- 10 2 4. (1) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) ①請求項 1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と請求項 1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター
- 15 蛋白質またはその塩と請求項 1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 2 5. (1) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) ①請求項 6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と請求項 6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター
- 20 蛋白質またはその塩と請求項 6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 25 2 6. 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質が、配列番号：2、

配列番号：4 または配列番号：6 で表わされるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質である請求項24 または25 記載のスクリーニング方法。

27. (1) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) ①請求項1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と請求項1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と請求項1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

28. (1) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) ①請求項6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩または②該レセプター蛋白質またはその塩と請求項6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と請求項6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

29. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩。

30. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列からなるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

31. 請求項29 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

32. 配列番号：5 で表される塩基配列からなるDNA。

33. 請求項31記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
34. 請求項33記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
35. 請求項34記載の形質転換体を培養し、請求項29記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項29記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
- 5 36. 請求項29記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
37. 請求項31記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。
- 10 38. 請求項29記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
39. 細胞遊走刺激剤である請求項38記載の医薬。
40. 抗炎症剤である請求項38記載の医薬。
41. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
- 15 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である請求項38記載の医薬。
- 20 42. 請求項31記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 25 43. 細胞遊走刺激剤である請求項42記載の医薬。
44. 抗炎症剤である請求項42記載の医薬。
45. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン

- ン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤である請求項42記載の医薬。
- 5
46. 請求項31記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断剤。
47. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
- 10
- 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である請求項46記載の診断剤。
- 15
48. 請求項37記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
49. 細胞遊走抑制剤である請求項48記載の医薬。
- 20
50. 感染症の予防・治療剤である請求項48記載の医薬。
51. 請求項36記載の抗体を含有してなる診断剤。
52. 喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、
- 25
- 頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、狭心

症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群、免疫不全または感染症の診断剤である請求項 5 1 記載の診断剤。

5 3. 請求項 3 6 記載の抗体を含有してなる医薬。

5 5 4. 細胞遊走抑制剤である請求項 5 3 記載の医薬。

5 5. 感染症の予防・治療剤である請求項 5 3 記載の医薬。

5 6. 請求項 3 1 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項 2 9 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 5 7. 請求項 3 1 記載のポリヌクレオチドを含有してなる請求項 2 9 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

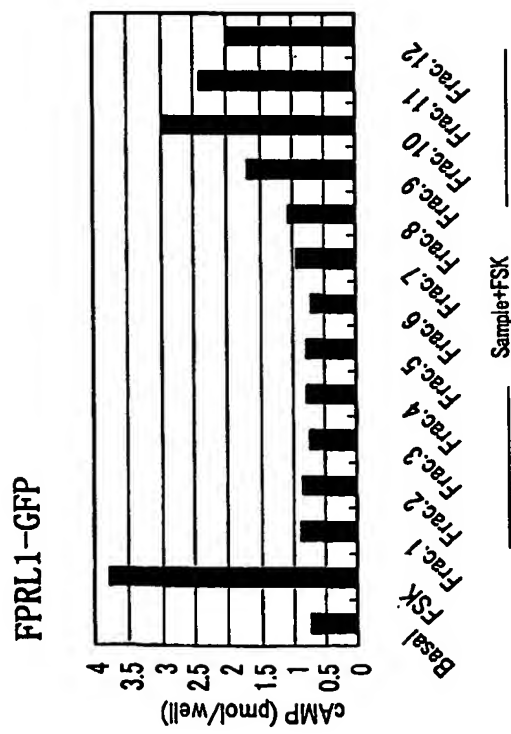
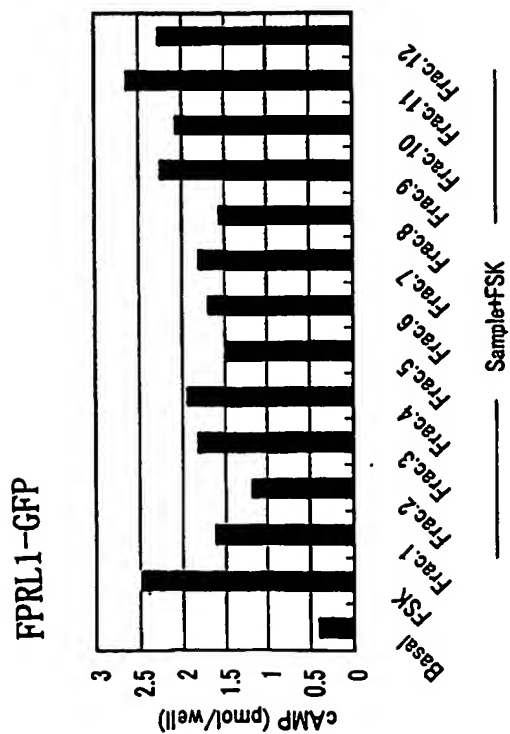
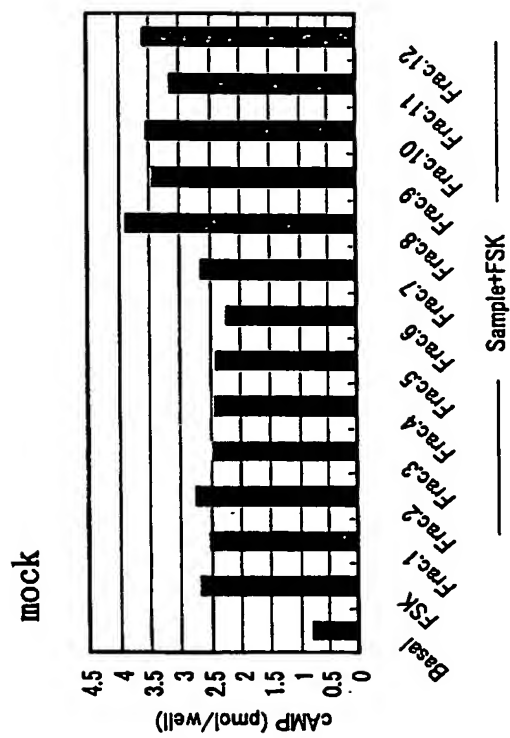
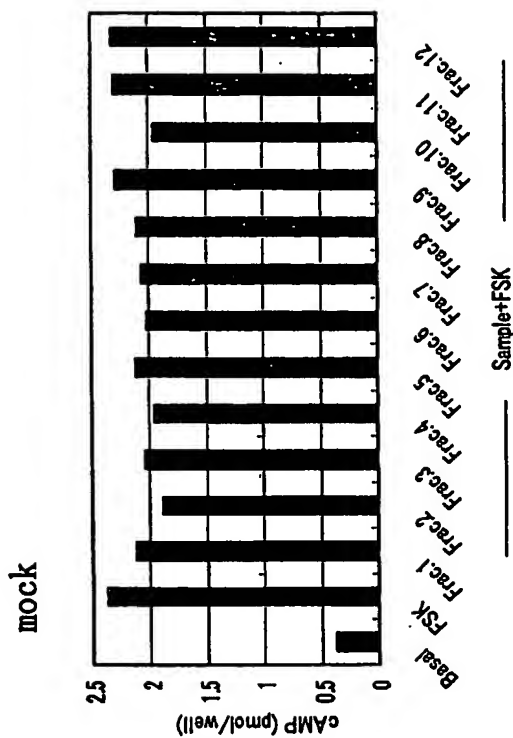
5 8. 哺乳動物に対して、(i) 請求項 1 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(ii) 請求項 6 記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(iii) 請求項 2 9 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または (iv) 請求項 3 1 記載のポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする細胞遊走刺激方法、または喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、
20 脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、ウイルス感染、
25 狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療方法。

5 9. 細胞遊走刺激剤または喘息、アレルギー疾患、炎症、炎症性眼疾患、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、全身性エリスマトーデス、乾せん、リウマチ、脳出血、脳梗塞、頭部外傷、脊髄損傷、脳浮腫、多発性硬化症、アルツハ

- イマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、エイズ脳症、髄膜炎、糖尿病、慢性関節リウマチ、変形性関節症、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎、滑膜炎、毒血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核、悪液質、動脈硬化症、クロイツフェルトーヤコブ病、
- 5 ウイルス感染、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、肝炎、移植医療後の過剰免疫反応、透析低血圧、汎発性血管内凝固症候群または免疫不全の予防・治療剤を製造するための（i）請求項1記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、（ii）請求項6記載のペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、（iii）請求項29記載のG蛋白質共役型レセプター
- 10 蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、または（iv）請求項31記載のポリヌクレオチドの使用。
60. 哺乳動物に対して、（i）請求項15記載の抗体、（ii）請求項16記載の抗体、（iii）請求項36記載の抗体、または（iv）請求項37記載のポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする細胞刺激抑制方法、または
- 15 感染症の予防・治療方法。
61. 細胞刺激抑制剤または感染症の予防・治療剤を製造するための（i）請求項15記載の抗体、（ii）請求項16記載の抗体、（iii）請求項36記載の抗体、または（iv）請求項37記載のポリヌクレオチドの使用。

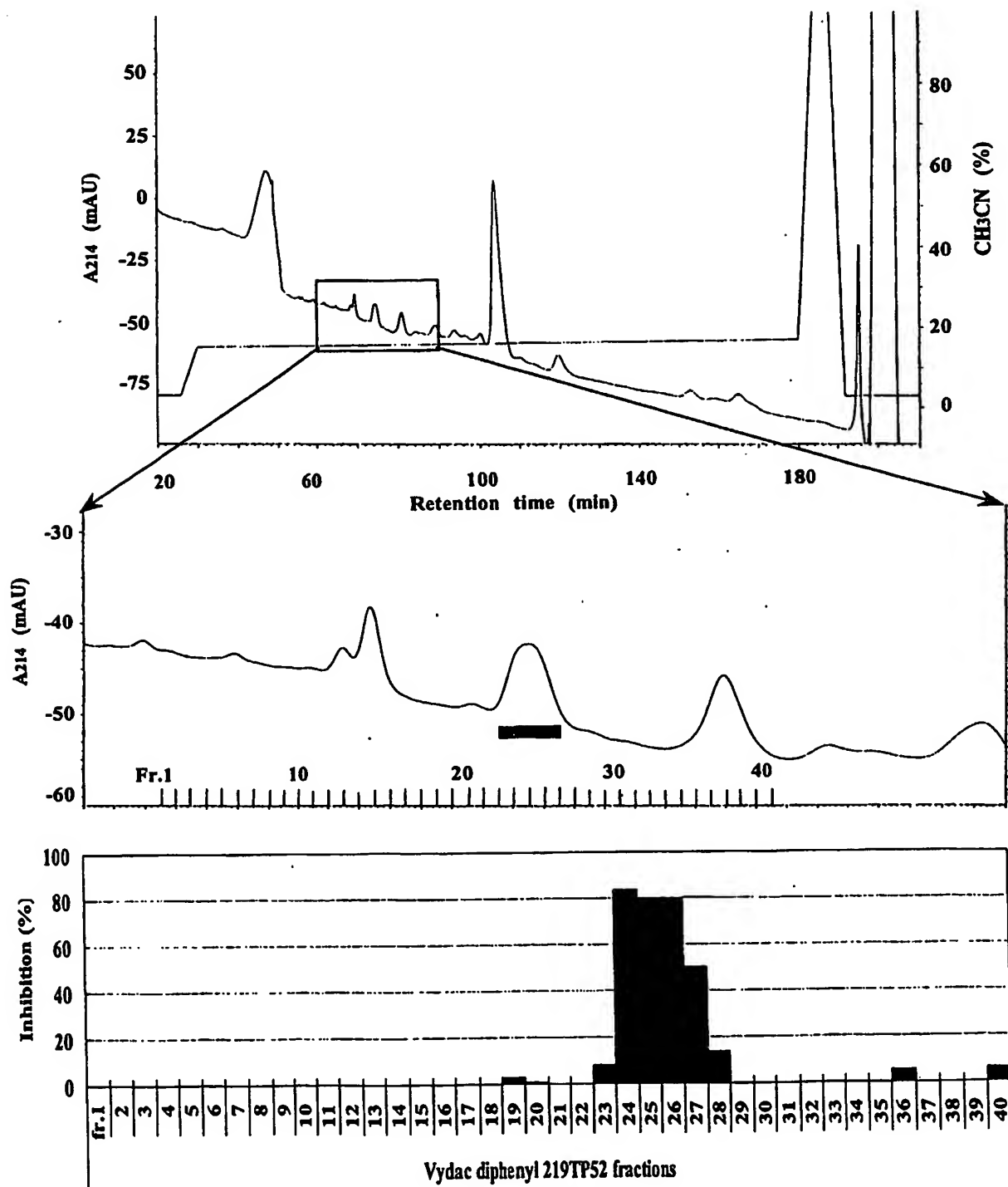
1/24

1



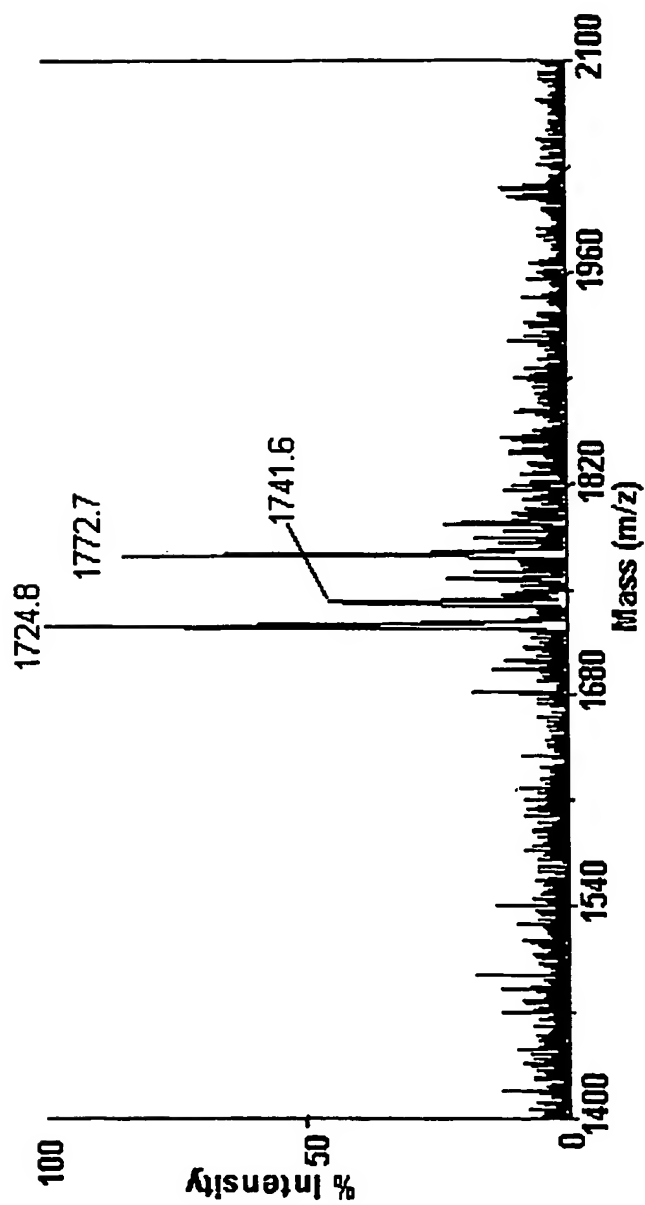
2/24

2



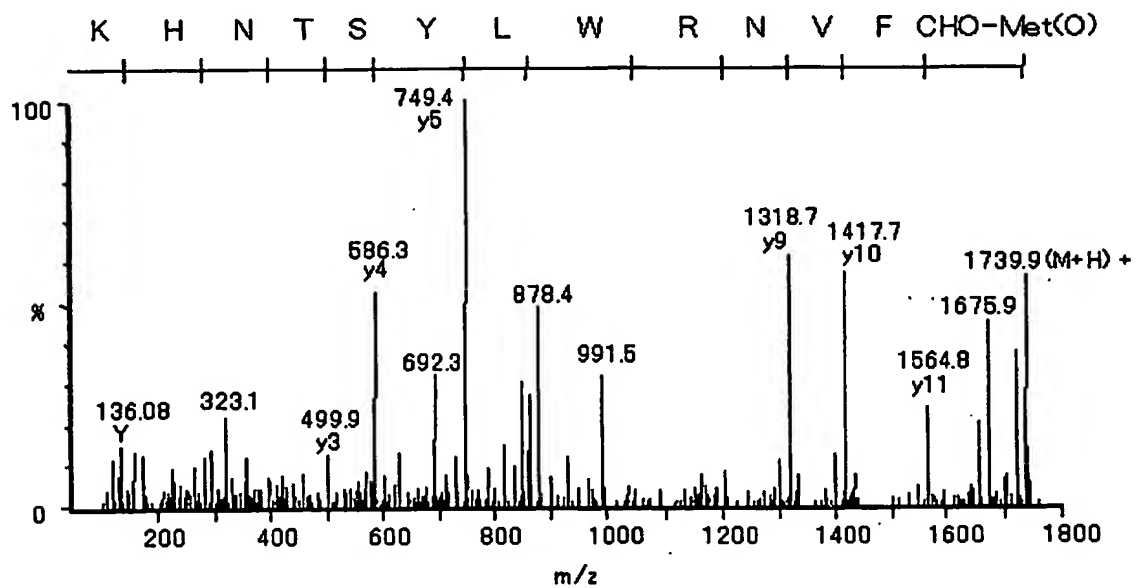
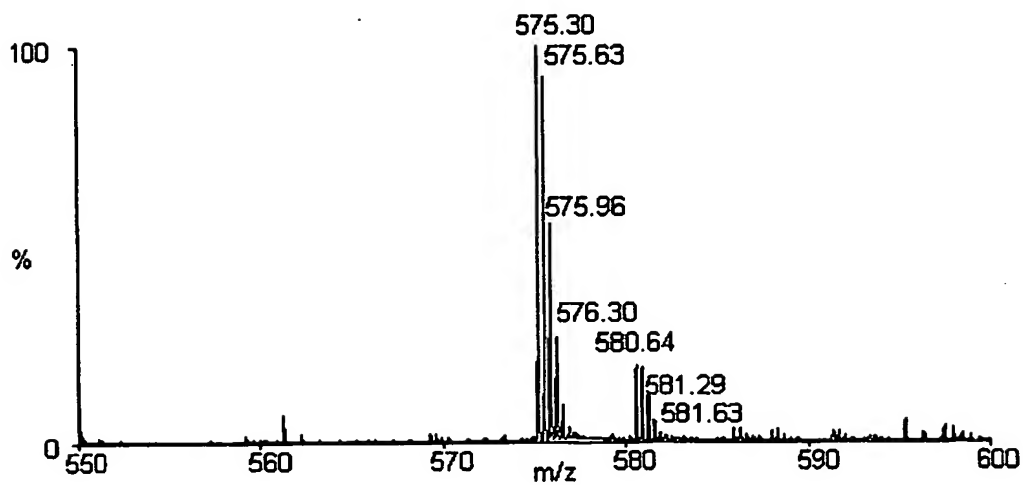
3/24

3



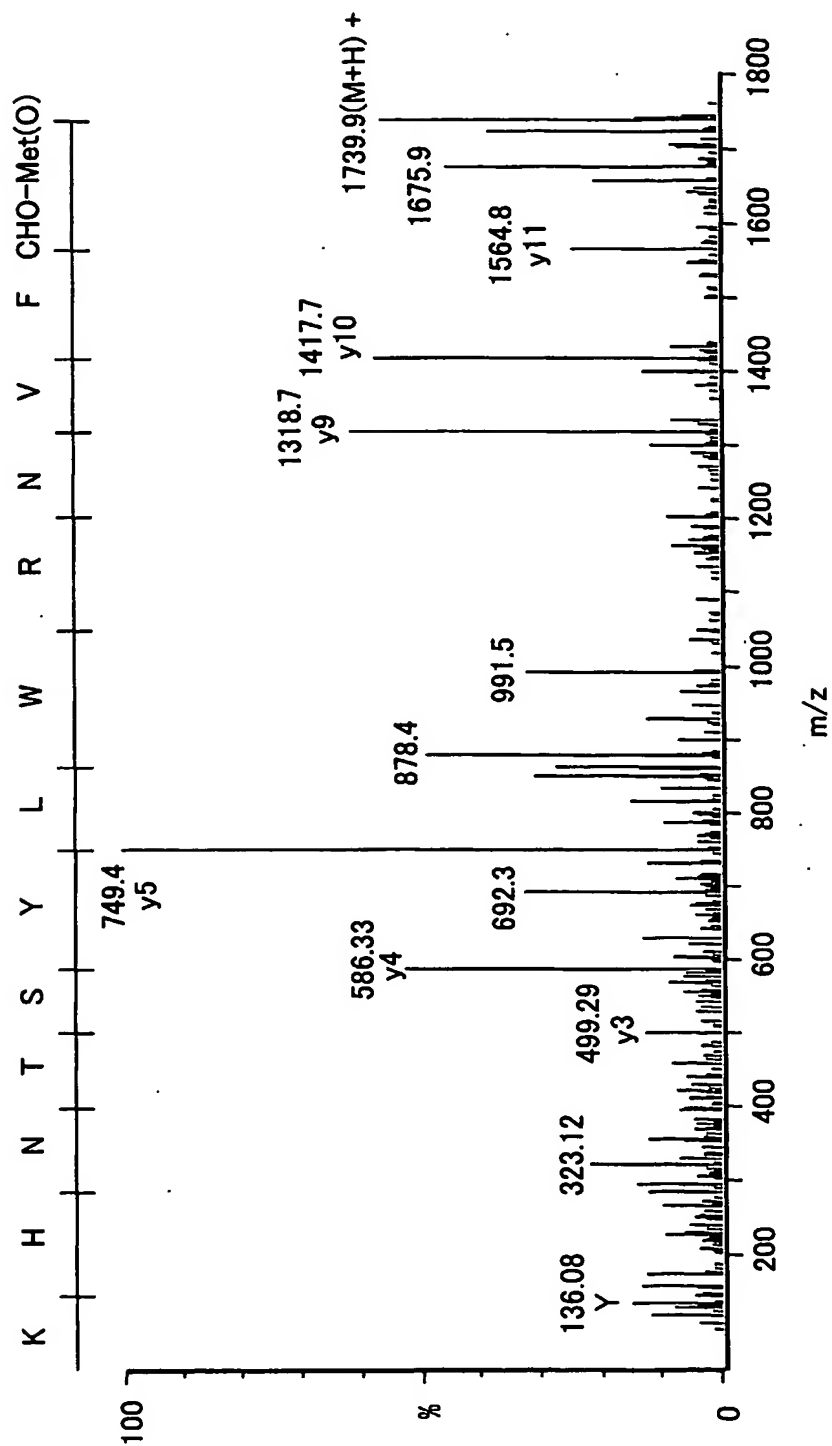
4/24

4



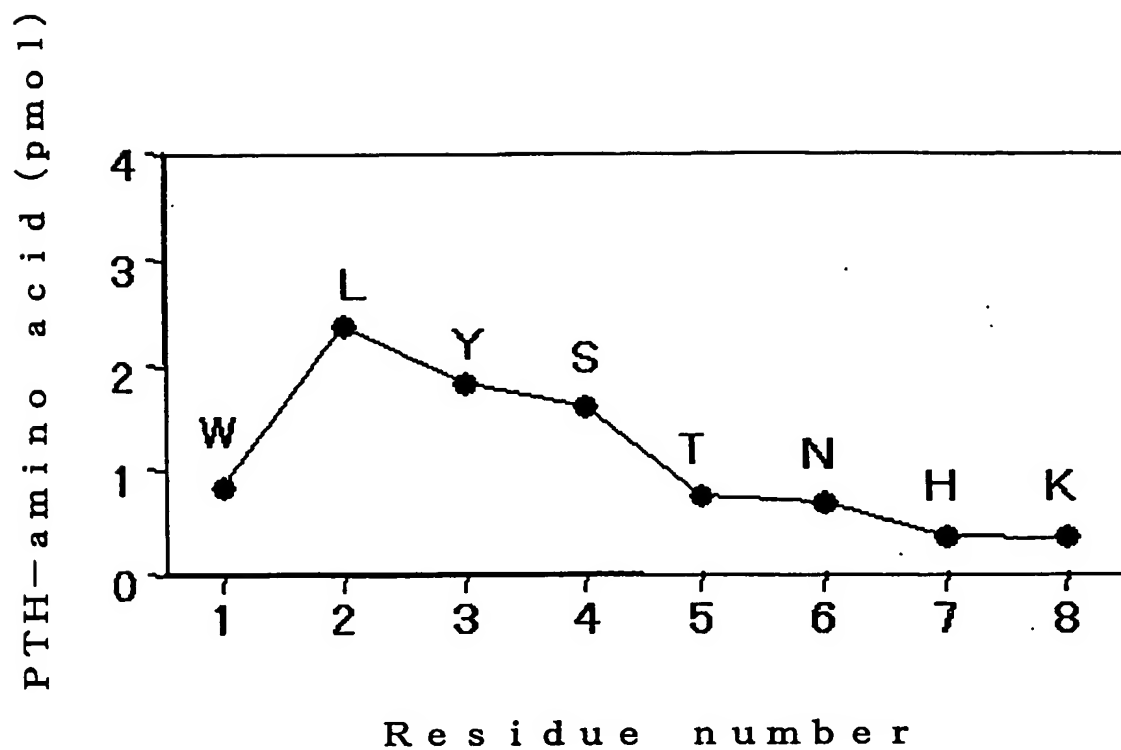
5/24

☒ 5



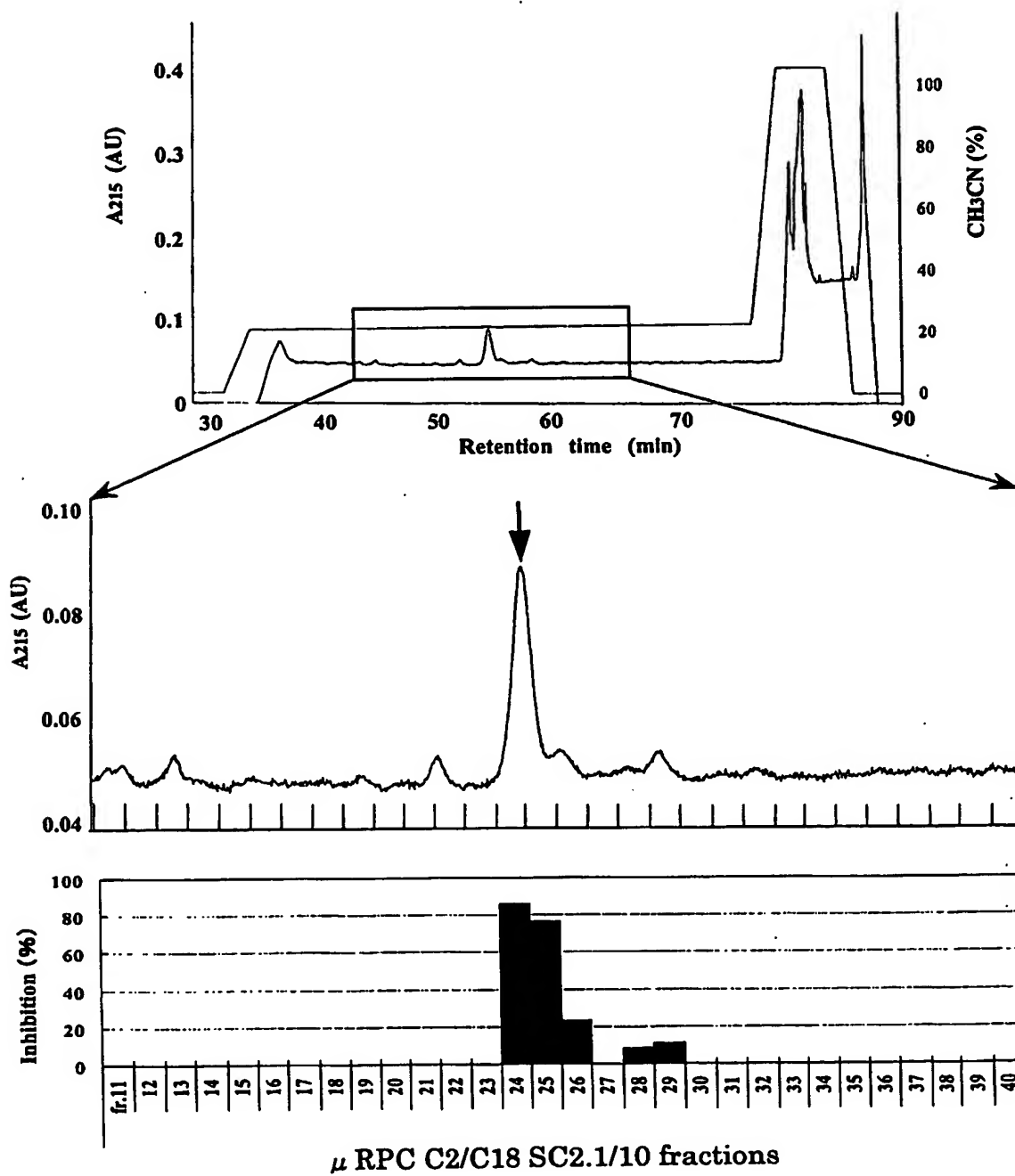
6/24

図 6



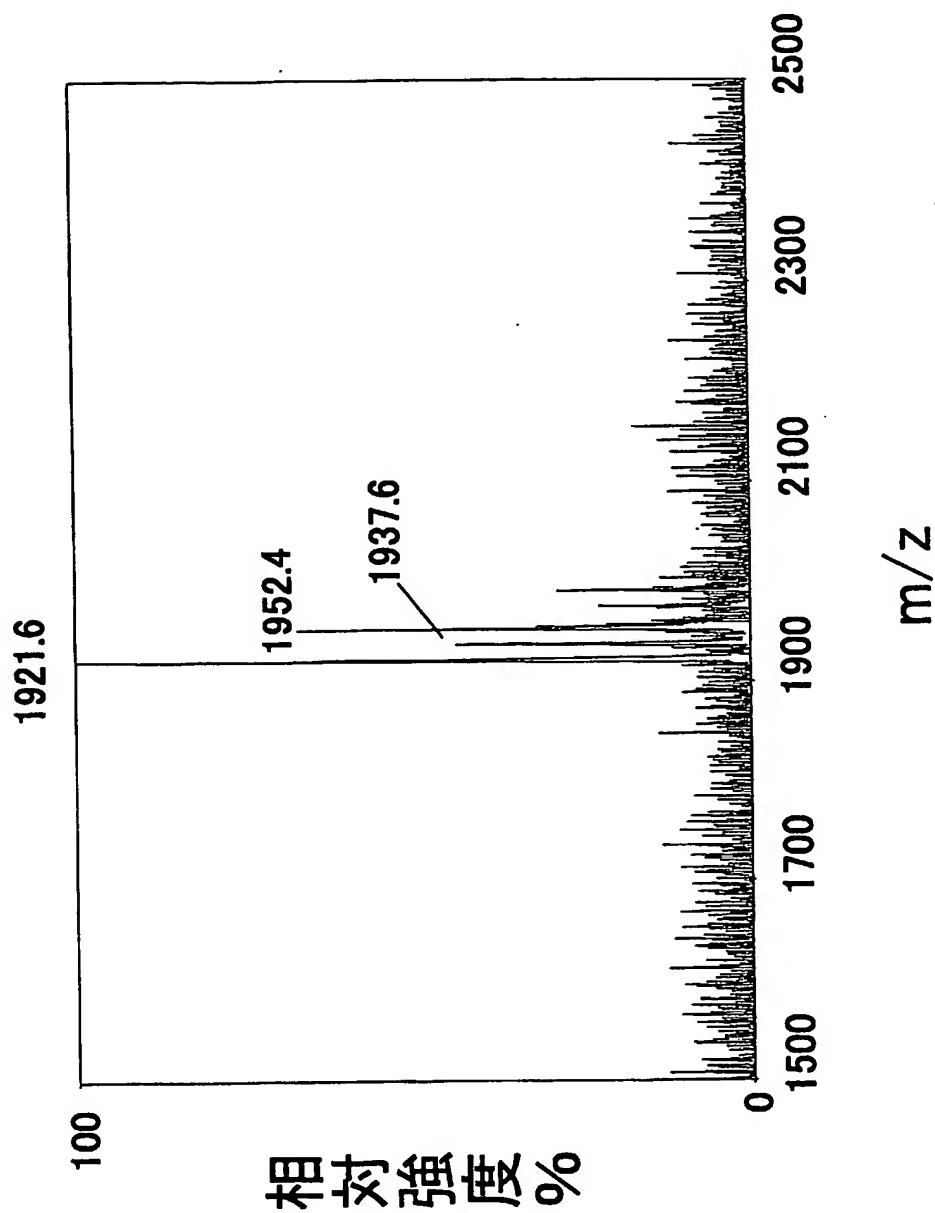
7/24

7



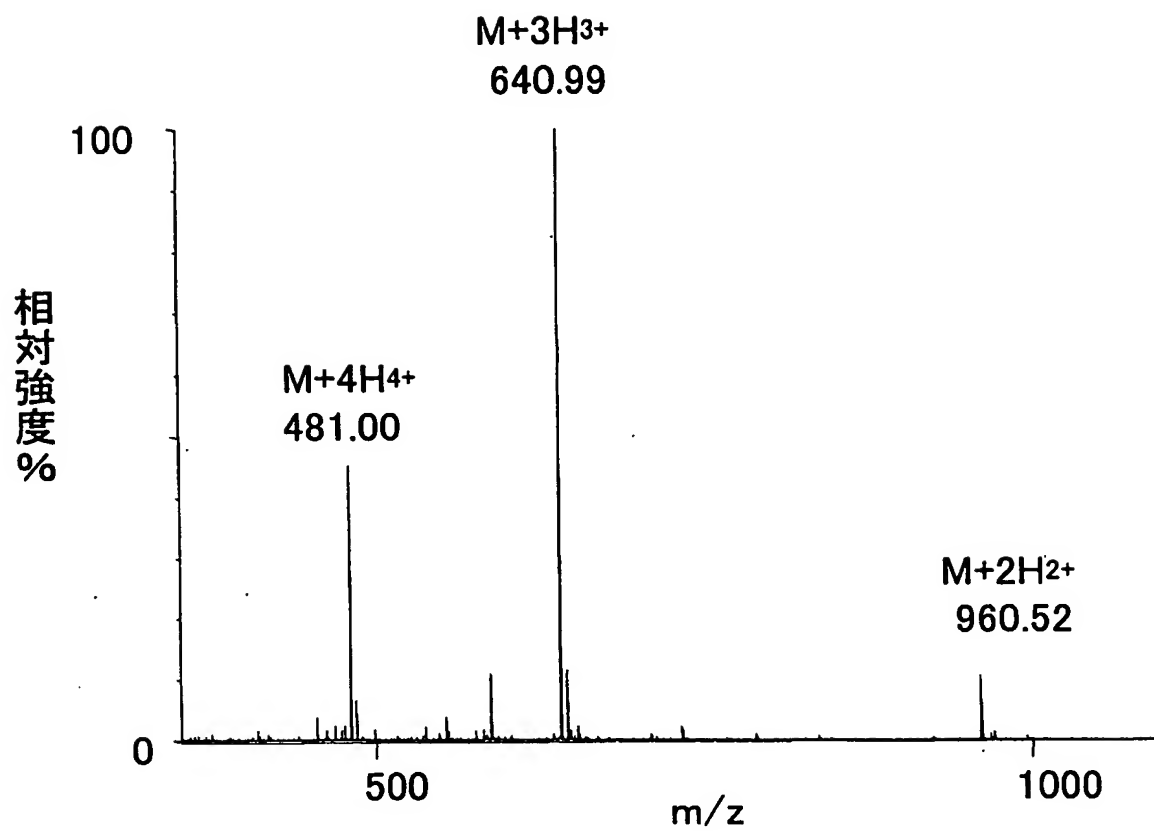
8/24

8



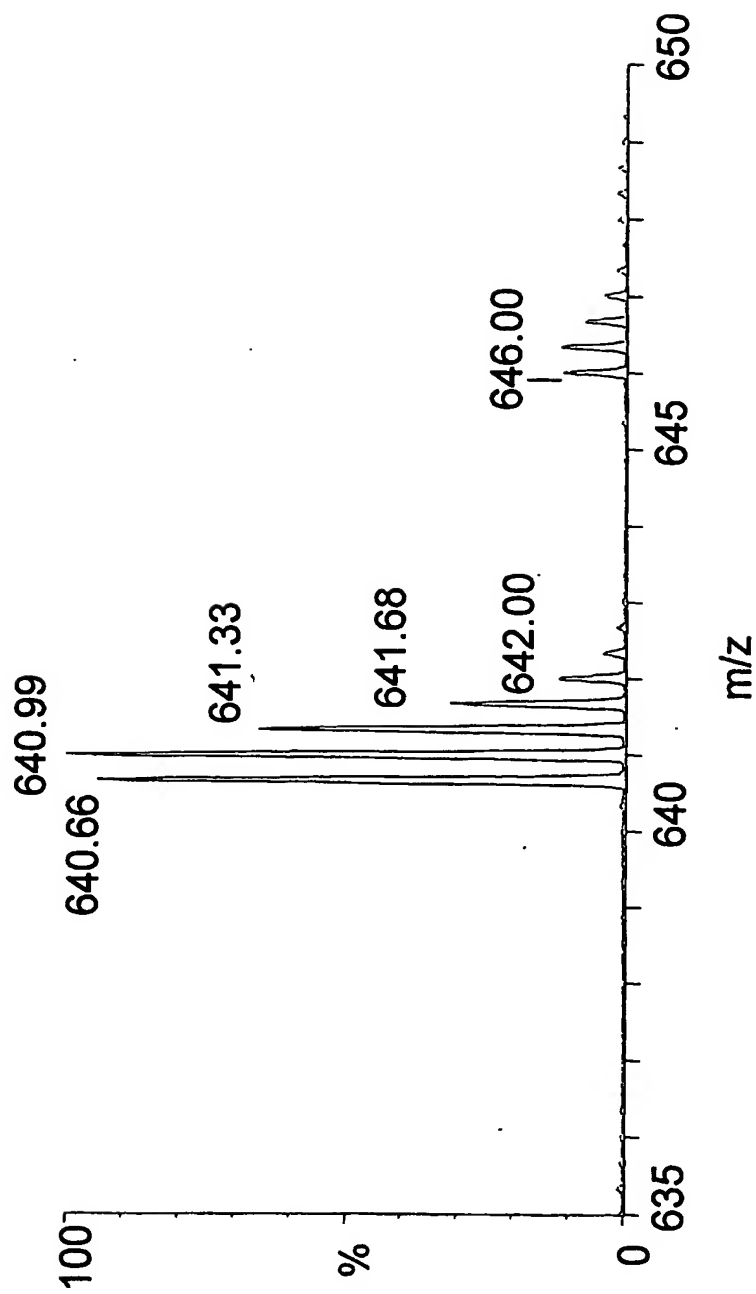
9/24

9



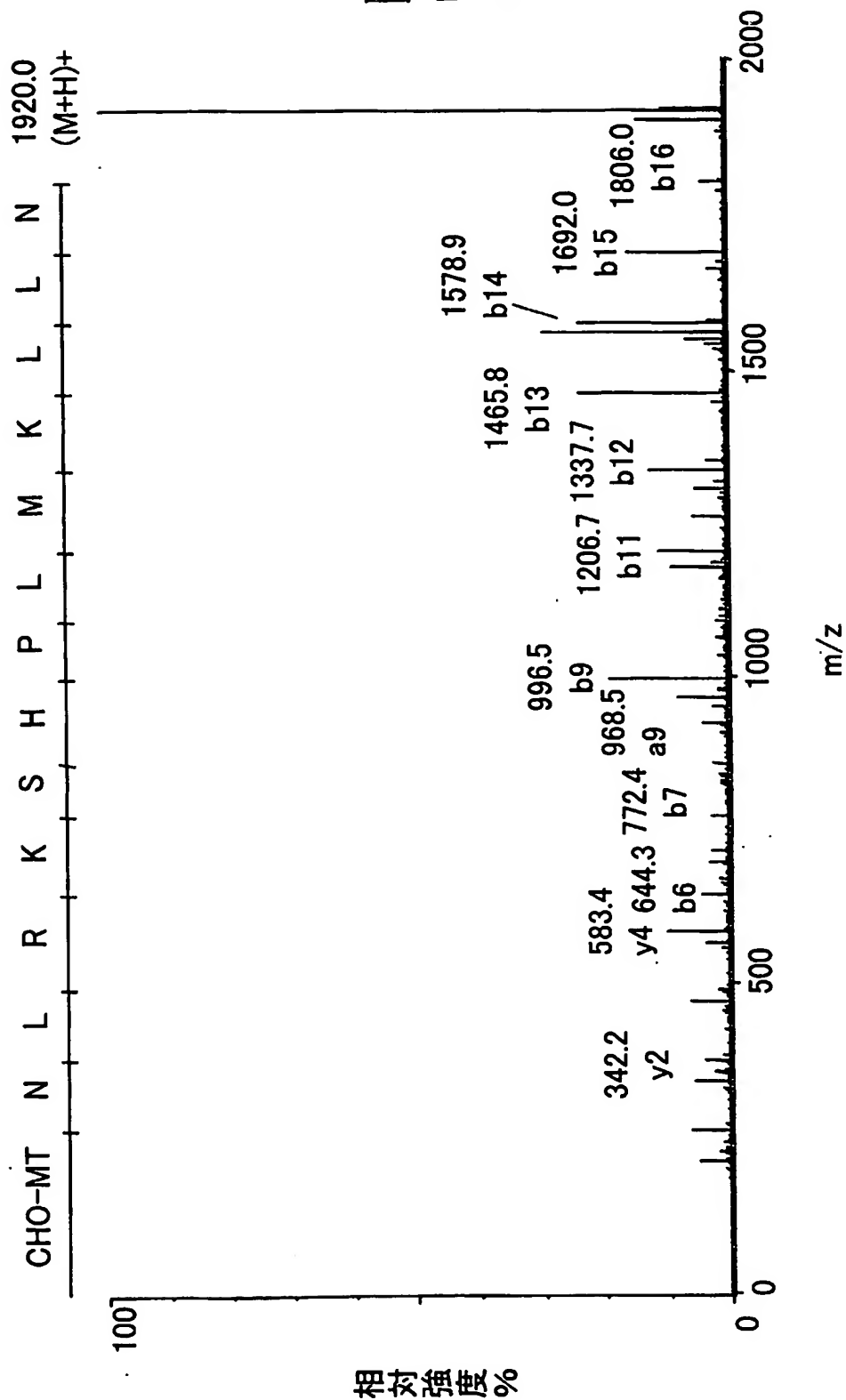
10/24

☒ 1 O



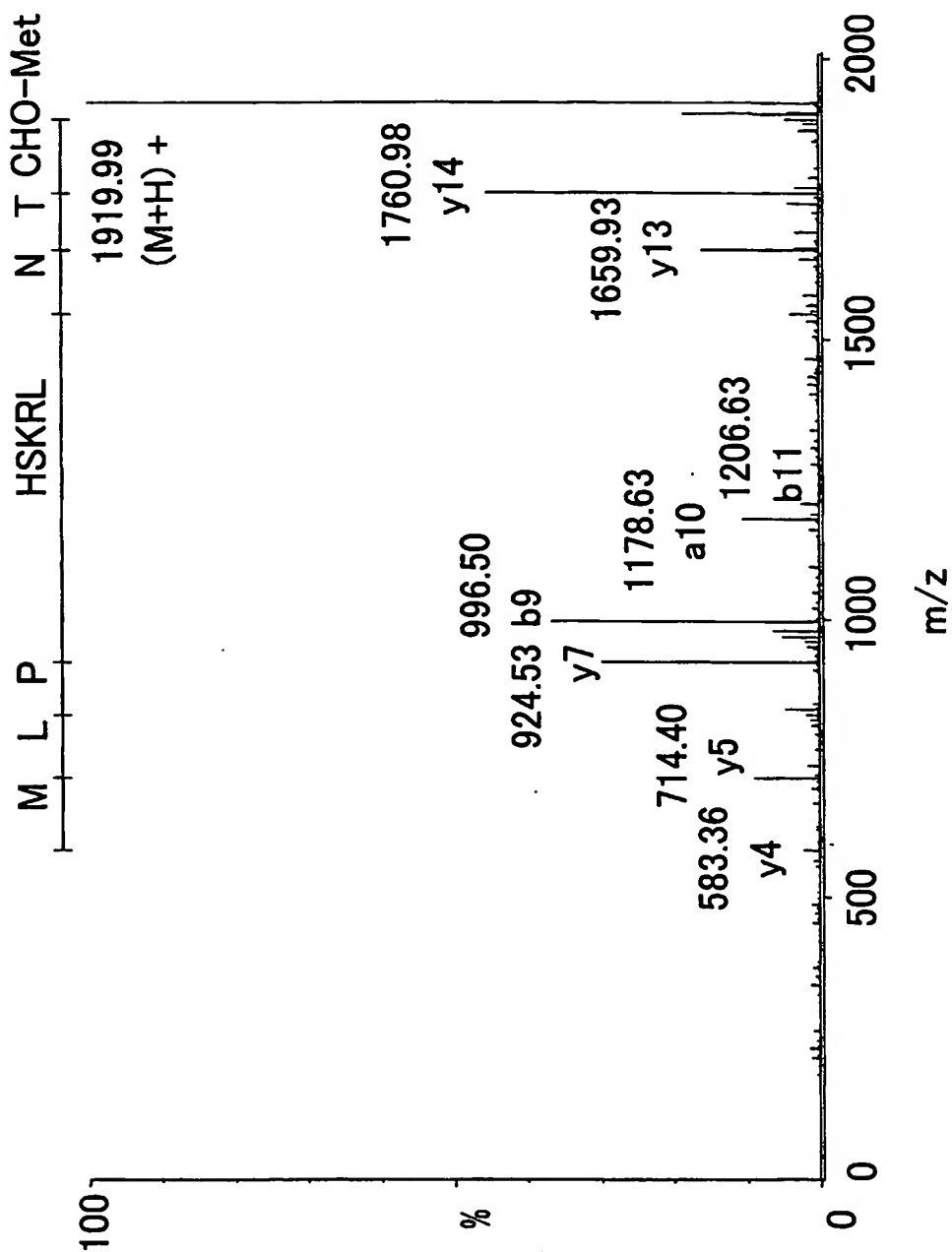
11/24

☒ 1 1



12/24

☒ 1 2



13/24

1 3

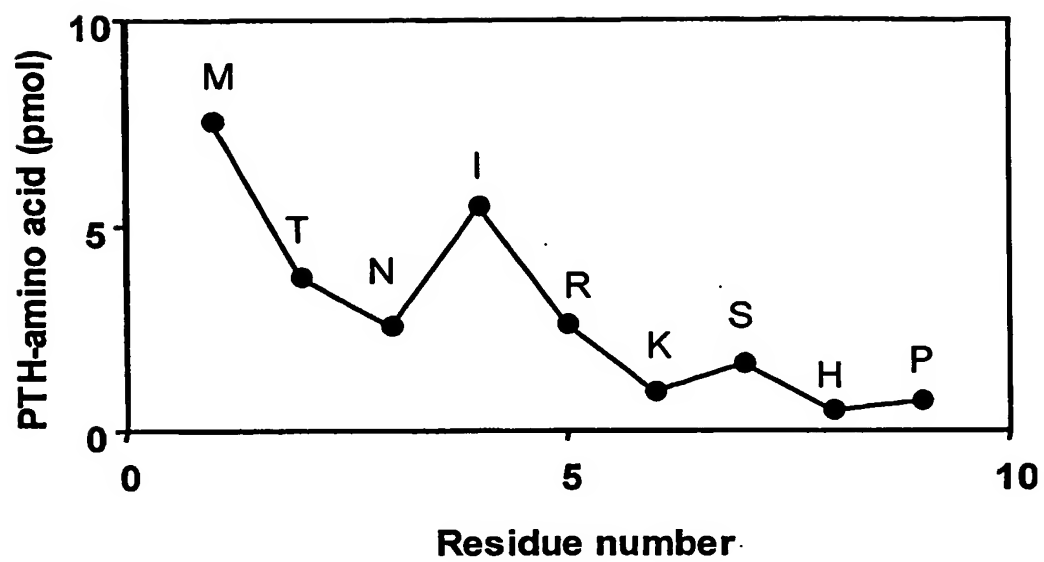
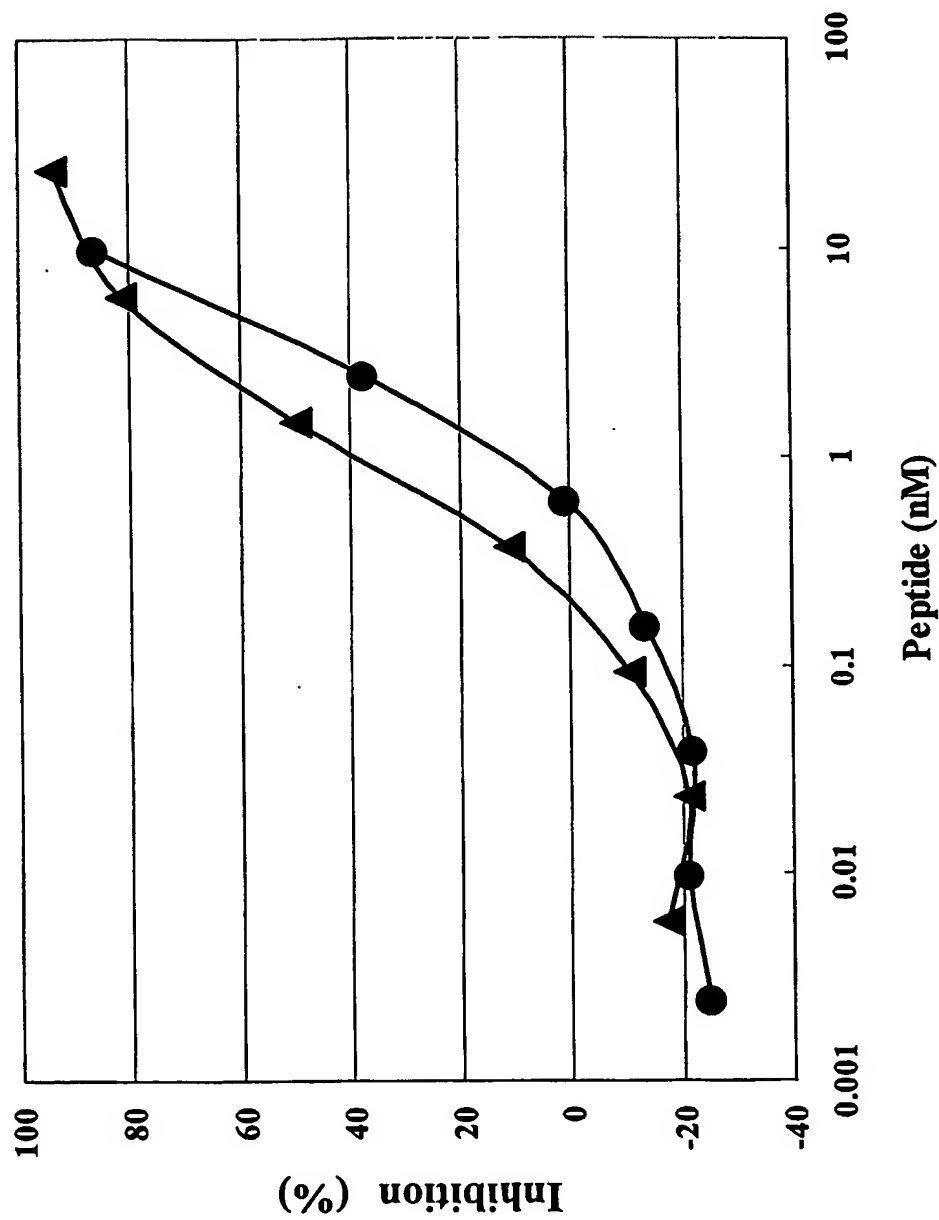
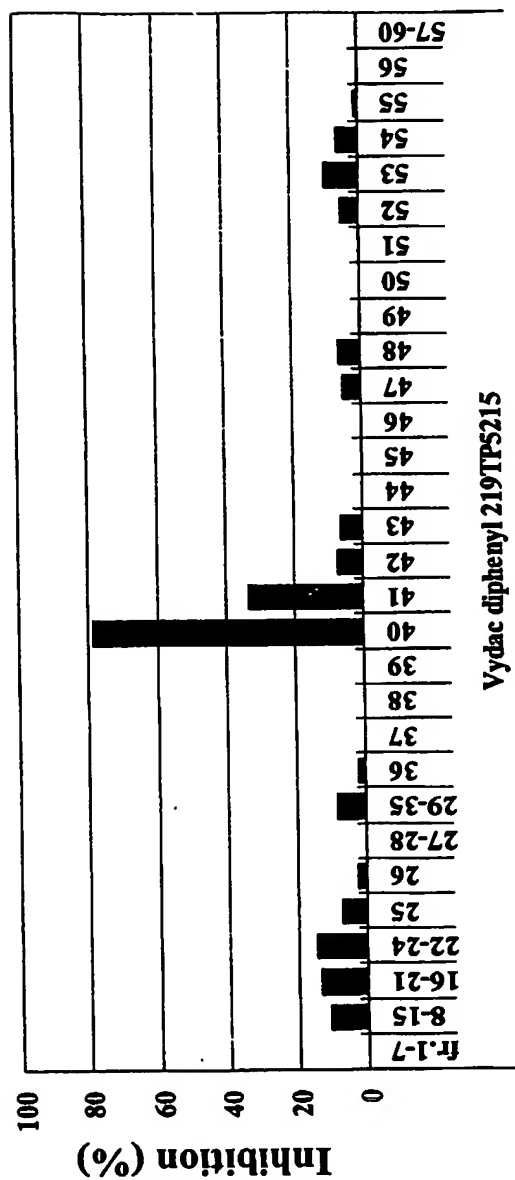
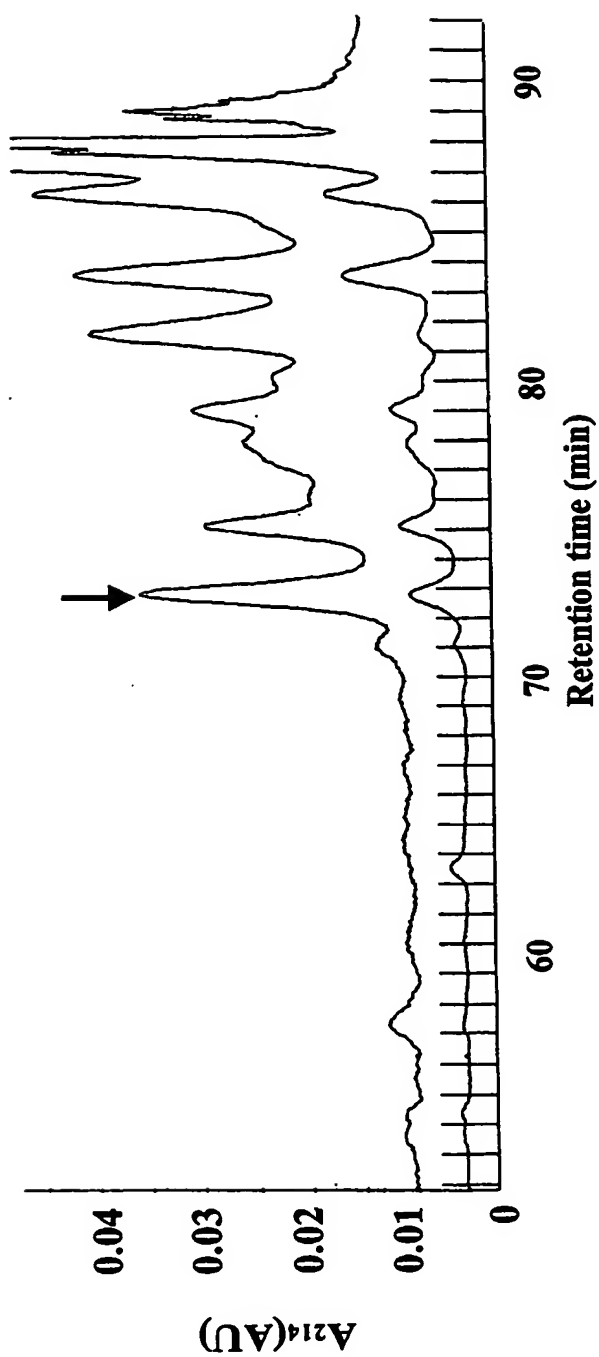


Figure 14



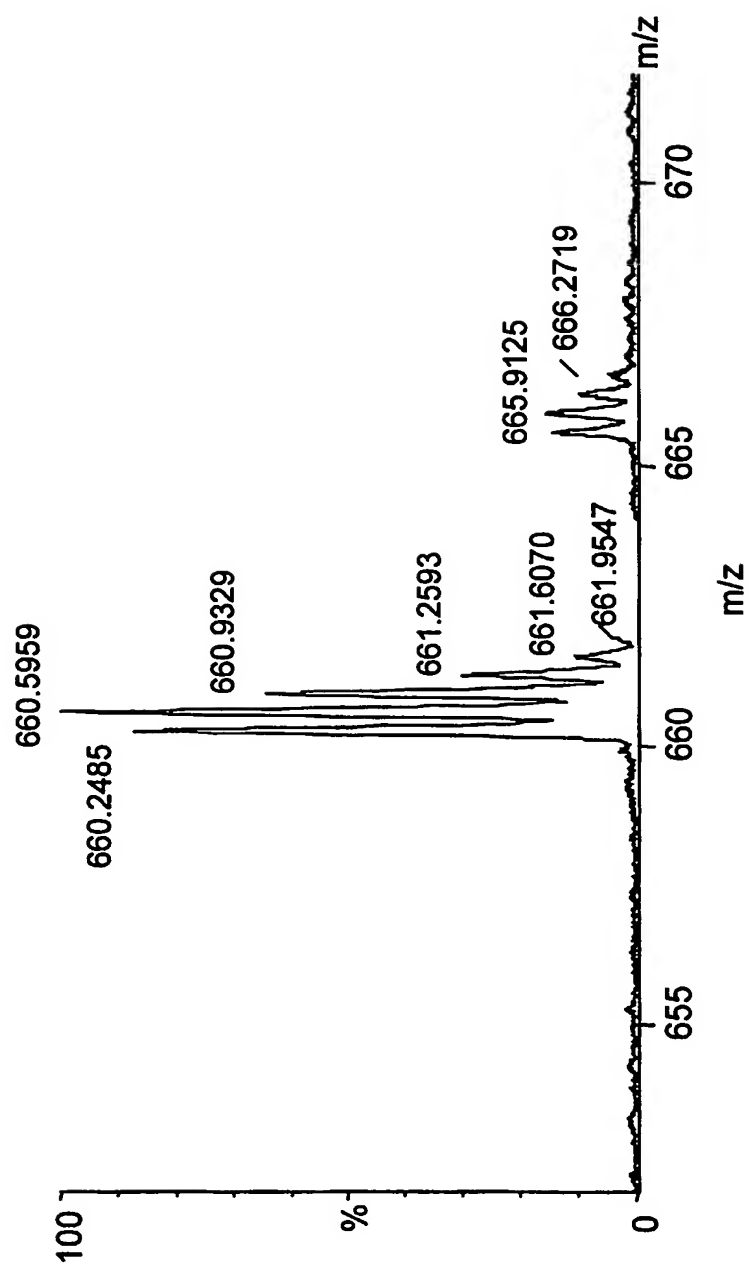
15/24

図 1 5



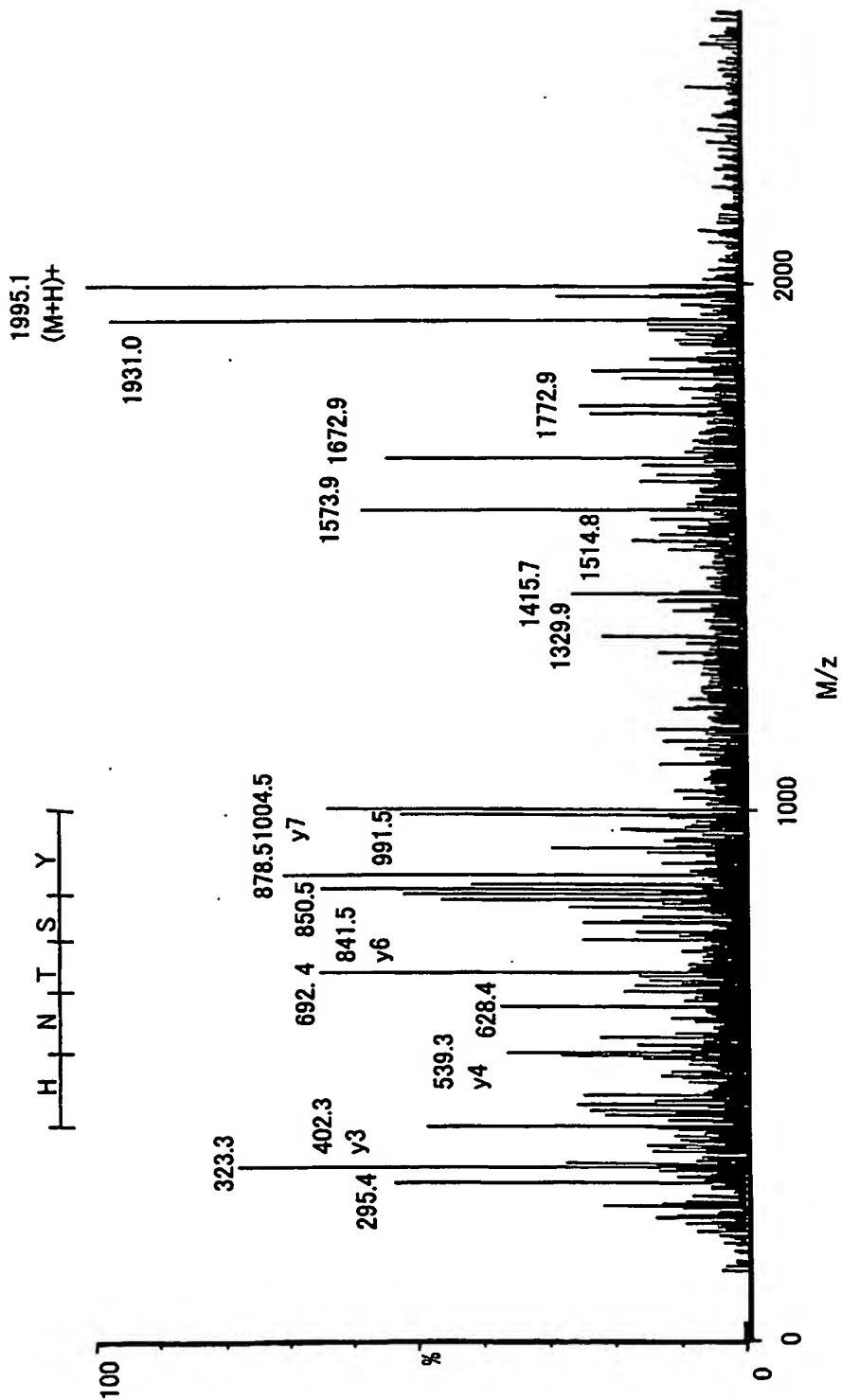
16/24

☒ 1 6

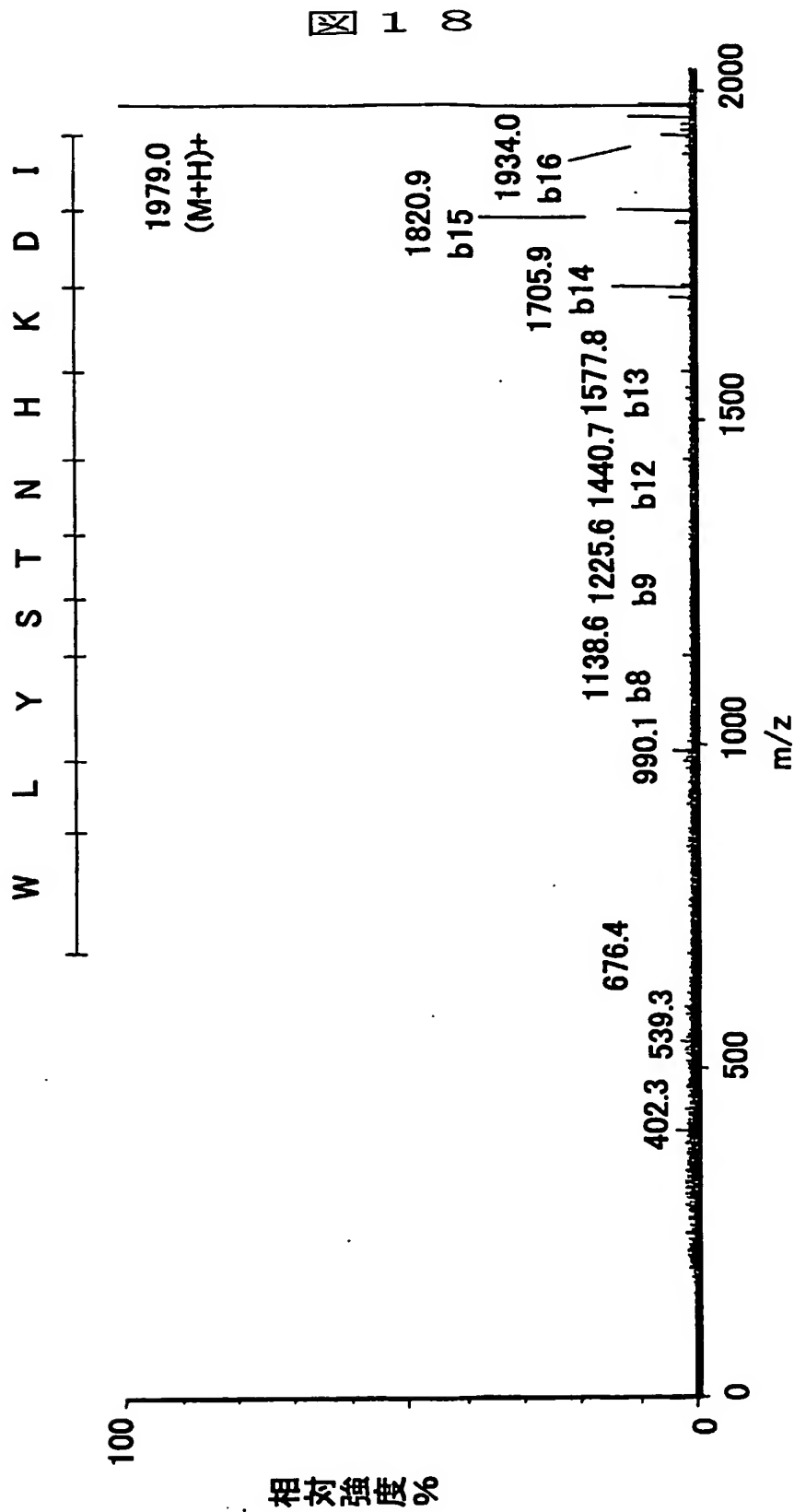


17/24

17

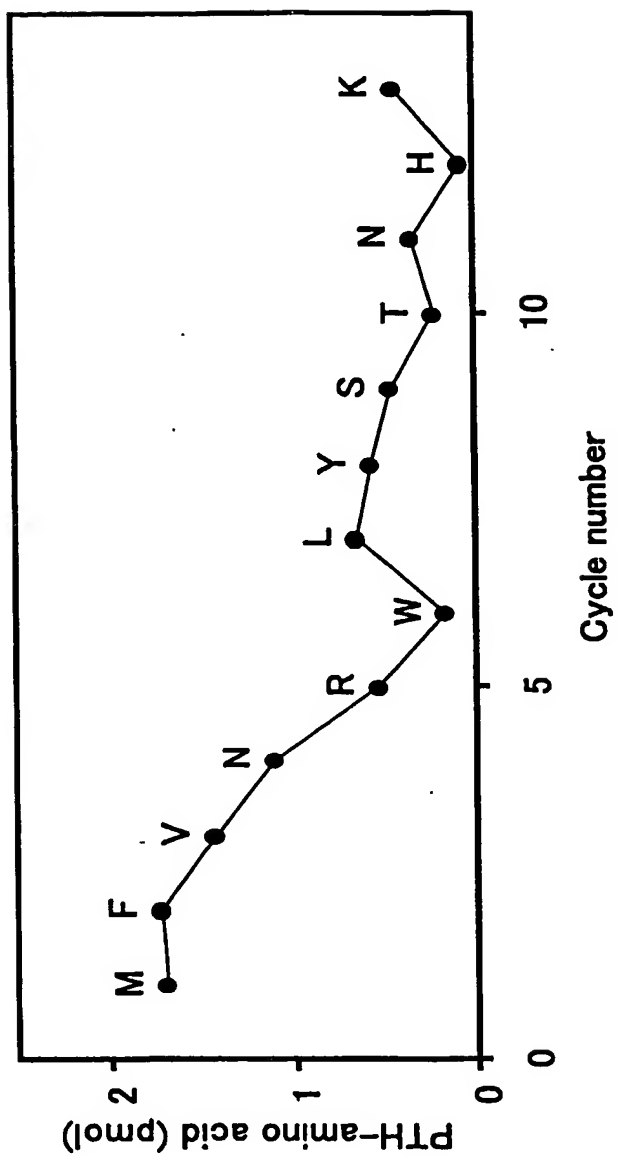


18/24



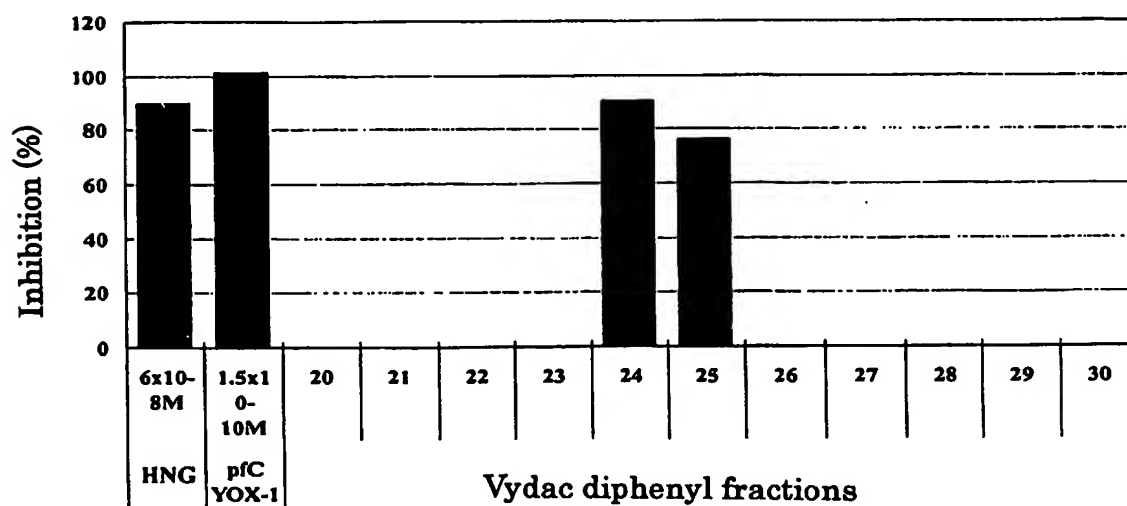
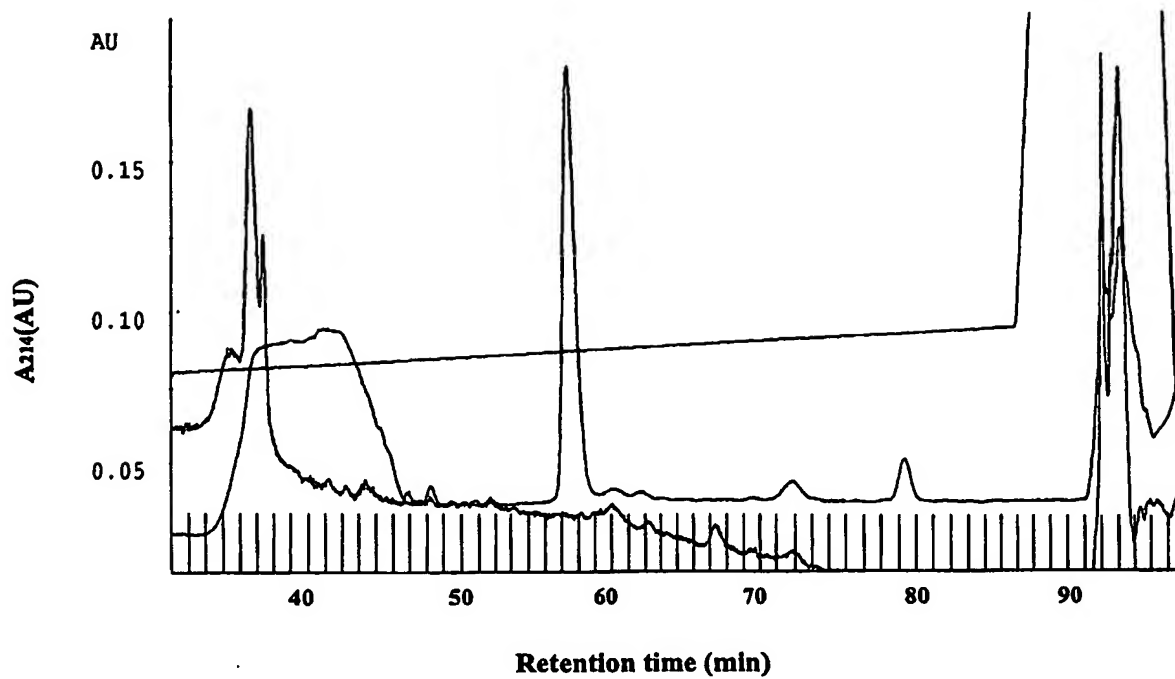
19/24

19

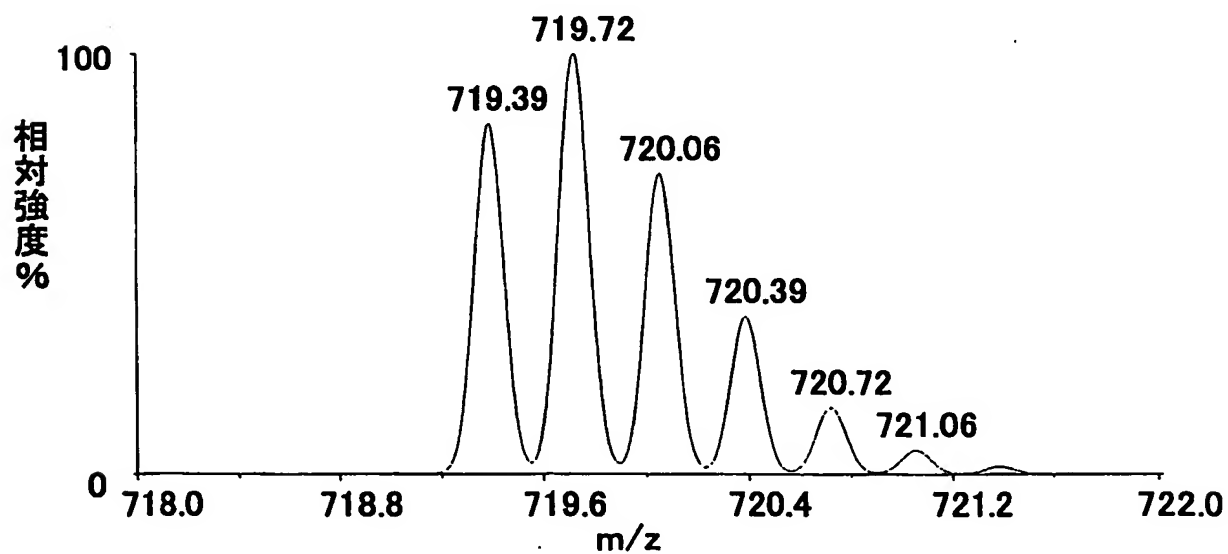
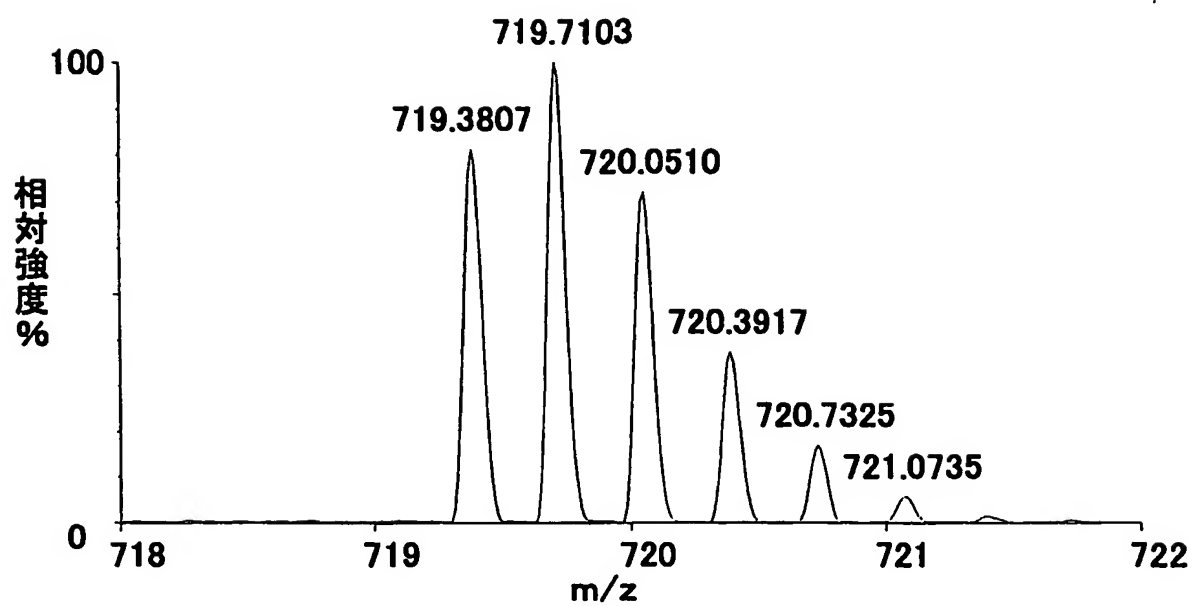


20/24

20

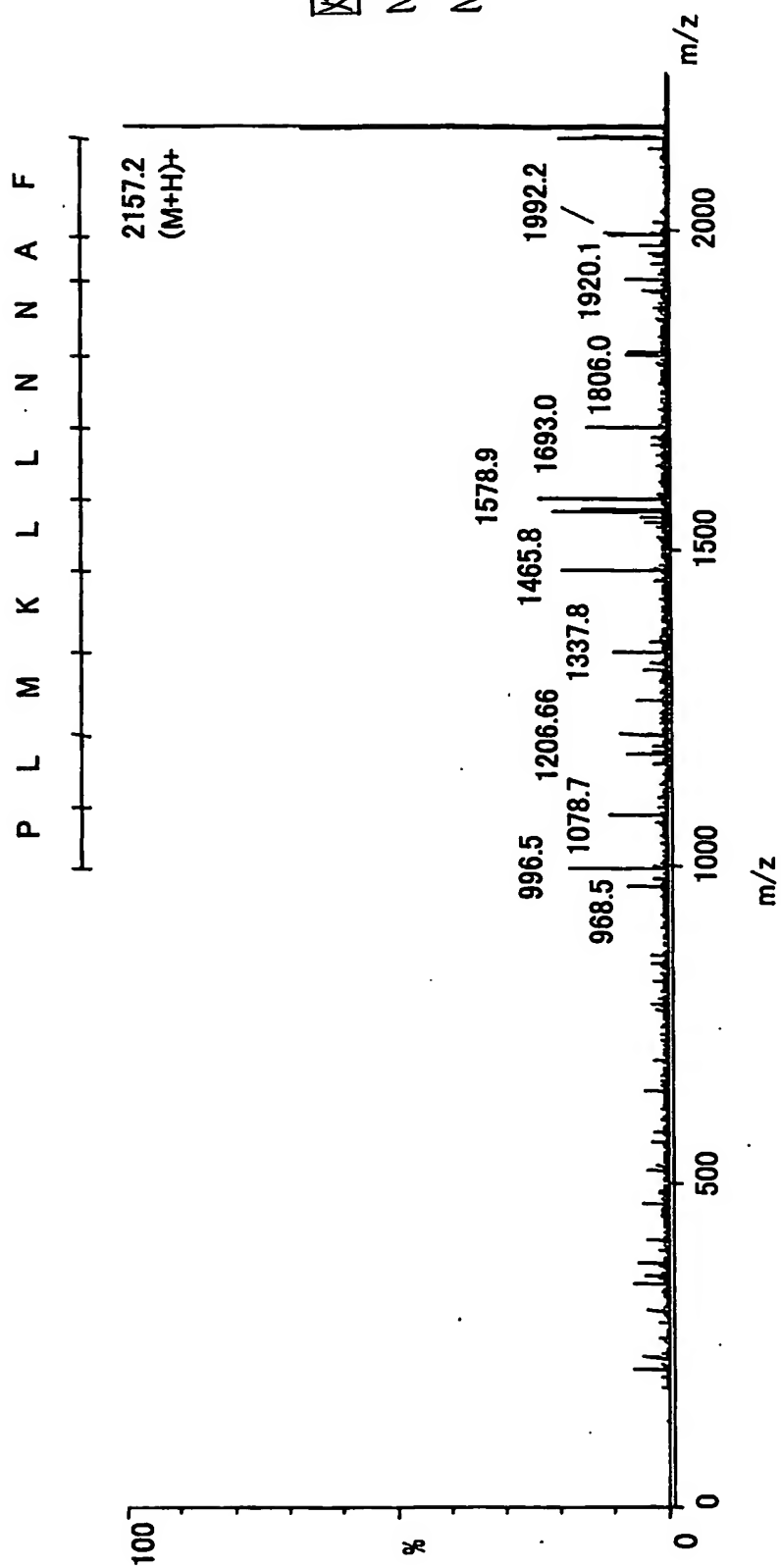


2 1



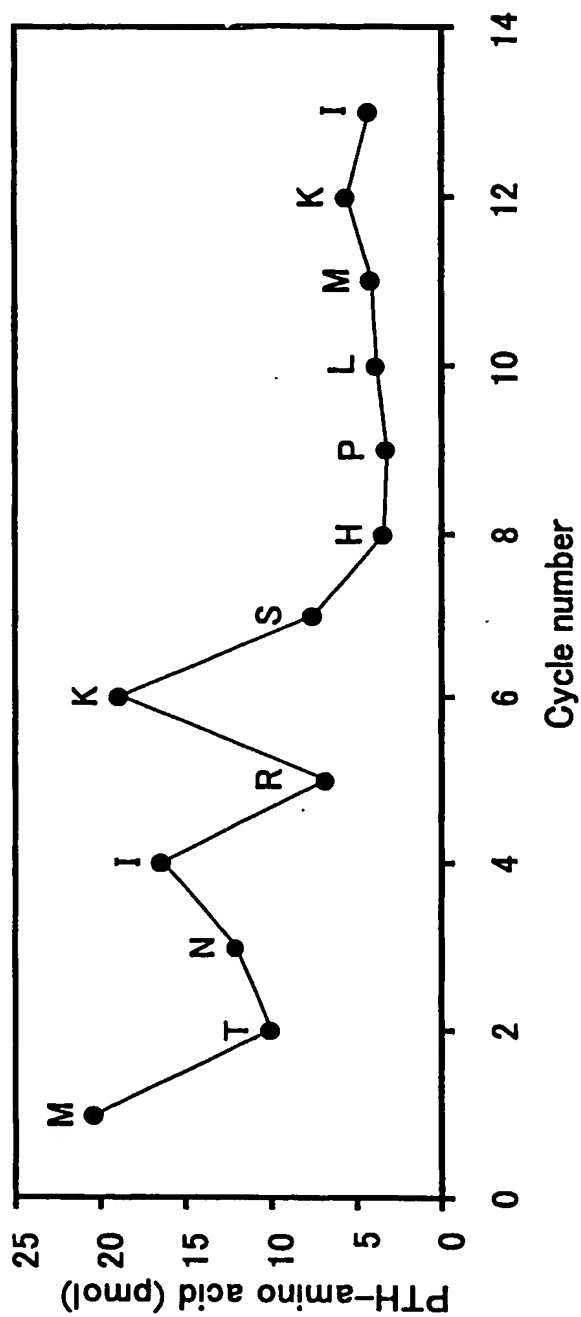
22/24

22



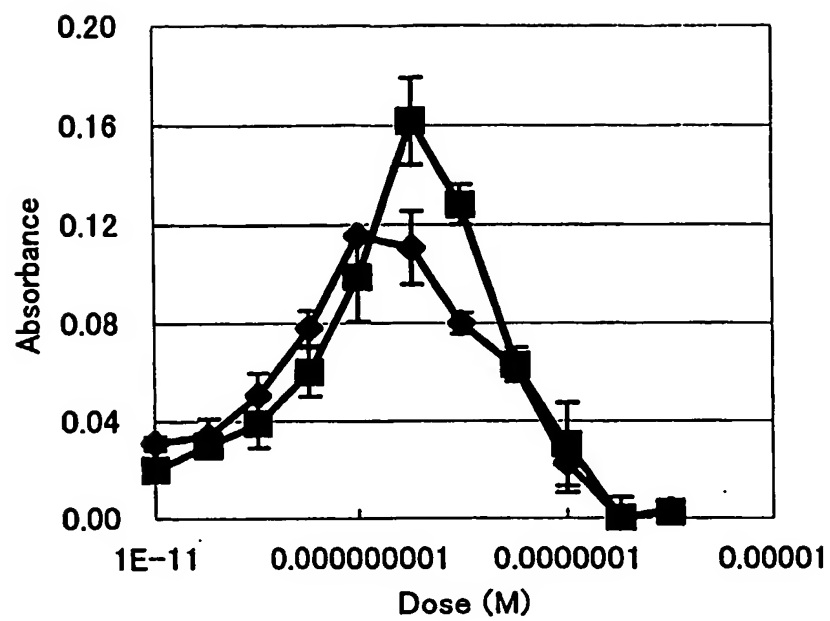
23/24

2 3



24/24

2 4



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> A Novel Ligand For FPRL1 And Its Use

<130> 3118W00P

<150> JP 2002-324189

<151> 2002-11-07

<150> JP 2002-367119

<151> 2002-12-18

<150> JP 2003-59073

<151> 2003-03-05

<150> JP 2003-191359

<151> 2003-07-03

<160> 24

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 1

Met Phe Val Asn Arg Trp Leu Tyr Ser Thr Asn His Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 351

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Glu Thr Asn Phe Ser Thr Pro Leu Asn Glu Tyr Glu Glu Val Ser

5 10 15

Tyr Glu Ser Ala Gly Tyr Thr Val Leu Arg Ile Leu Pro Leu Val Val
20 25 30
Leu Gly Val Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile
35 40 45
Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val Thr Thr Ile Cys Tyr
50 55 60
Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe
65 70 75 80
Leu Ile Val Ser Met Ala Met Gly Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe
85 90 95
Leu Cys Lys Leu Ile His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser
100 105 110
Val Phe Leu Ile Gly Phe Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu
115 120 125
His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Met Lys
130 135 140
Val Ile Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Val Leu Thr Leu Pro Val
145 150 155 160
Phe Leu Phe Leu Thr Thr Val Thr Ile Pro Asn Gly Asp Thr Tyr Cys
165 170 175
Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Gly Thr Pro Glu Glu Arg Leu Lys
180 185 190
Val Ala Ile Thr Met Leu Thr Ala Arg Gly Ile Ile Arg Phe Val Ile
195 200 205
Gly Phe Ser Leu Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile
210 215 220
Ala Ala Lys Ile His Lys Lys Gly Met Ile Lys Ser Ser Arg Pro Leu

225 230 235 240
Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
 245 250 255
Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Leu Lys Glu Met Leu
 260 265 270
Phe Tyr Gly Lys Tyr Lys Ile Ile Asp Ile Leu Val Asn Pro Thr Ser
 275 280 285
Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe
 290 295 300
Val Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Thr Ser
305 310 315 320
Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Ala Pro Thr Asn Asp Thr Ala
 325 330 335
Ala Asn Ser Ala Ser Pro Pro Ala Glu Thr Glu Leu Gln Ala Met
 340 345 350

<210> 3

<211> 1053

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

atggaaacca acttctccac tcctctgaat gaatatgaag aagtgtccta tgagtctgct 60
ggctacactg ttctgcggat cctcccattg gtggtgcttg gggtcacctt tgcctcggg 120
gtcctgggca atgggcttgt gatctgggtg gctggattcc ggatgacacg cacagtcacc 180
accatctgtt acctgaacct ggccctggct gacttttctt tcacggccac attaccattc 240
ctcattgtct ccatggccat gggagaaaaa tggccttttg gctggttcct gtgtaagtta 300
attcacatcg tggaggacat caacctcttt ggaagtgtct tcttgattgg tttcattgca 360
ctggaccgct gcatttgtgt cctgcatcca gtctgggccc agaaccaccg cactgtgagt 420

ctggccatga aggtgatcgt cggaccttgg attcttgctc tagtccttac cttgccagtt 480
ttcctctttt tgactacagt aactattcca aatggggaca catactgtac tttcaacttt 540
gcatcctggg gtggcacccc tgaggagagg ctgaaggtgg ccattaccat gctgacagcc 600
agagggatta tccggtttgt cattggcttt agcttgccga tgtccattgt tgccatctgc 660
tatgggctca ttgcagccaa gatccacaaa aaggcatga ttaaaccag ccgtccctta 720
cgggtcctca ctgctgtggt ggcttctttc ttcactgtt ggtttccctt tcaactggtt 780
gcccttctgg gcaccgtctg gctcaaagag atgttgttct atggcaagta caaaatcatt 840
gacatcctgg ttaaccacac gagctccctg gccttcttca acagctgcct caaccccatg 900
ctttacgtct ttgtgggcca agacttccga gagagactga tccactccct gccaccagt 960
ctggagaggg ccctgtctga ggactcagcc ccaactaatg acacggctgc caattctgct 1020
tcacctctg cagagactga gttacaggca atg 1053

<210> 4

<211> 351

<212> PRT

<213> Rat

<400> 4

Met Glu Ala Asn Tyr Ser Ile Pro Leu Asn Val Ser Glu Val Val Val

5

10

15

Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Thr Met Val Val

20

25

30

Leu Ser Ile Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35

40

45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Val His Thr Val Thr Thr Thr Cys Phe

50

55

60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Val Thr Leu Pro Phe

65

70

75

80

Phe Val Ile Ser Ile Ala Met Lys Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe

85	90	95	
Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser			
100	105	110	
Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu			
115	120	125	
His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys			
130	135	140	
Val Val Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile			
145	150	155	160
Phe Ile Phe Met Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asn Val Tyr Cys			
165	170	175	
Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Asn Thr Ala Glu Glu Leu Leu Asn			
180	185	190	
Ile Ala Asn Thr Phe Val Thr Val Arg Gly Ser Ile Arg Phe Ile Ile			
195	200	205	
Gly Phe Ile Met Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile			
210	215	220	
Ala Val Lys Ile His Arg Arg Ala Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu			
225	230	235	240
Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro			
245	250	255	
Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Ile Trp Phe Lys Glu Ser Leu			
260	265	270	
Phe Ser Gly Arg Tyr Lys Ile Leu Asp Met Trp Val His Pro Thr Ser			
275	280	285	
Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Ala Phe			
290	295	300	

Met Gly Gln Asp Phe His Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Ser Ser

305

310

315

320

Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Thr Gly

325

330

335

Ile Ser Ser Ala Leu Pro Pro Val Asn Ile Asp Ile Lys Ala Ile

340

345

350

<210> 5

<211> 1053

<212> DNA

<213> Rat

<400> 5

atggaagcca actattccat ccctctgaat gtatcagaag tggttgtcta tgattctacc	60
atctccagag ttttgtggat cctcacaatg gtggttctct ccatcacctt tgtcctgggt	120
gtgctgggta atggactagt gatctgggta gctggattcc ggatggtaca cactgtcacc	180
actacctgtt ttctgaatct agctttggct gacttctctt tcacagtgac tctaccattc	240
tttgtcatct caattgctat gaaagaaaaa tggccttttg gatggttcct gtgtaaatta	300
gttcacattg tagtagacat aaacctcttt ggaagtgtct tcctgattgc ttttaattgcc	360
ttggaccgct gcatttgtgt cctgcatcca gtctgggctc agaaccaccg cactgtgagc	420
ctggctagga aggtggttgt tgggccctgg attttagctc tgattctcac tttgcccatt	480
tttattttca tgactacagt tagaattcct ggaggcaatg tgtactgtac attcaacttc	540
gcatcctggg gtaacactgc tgaagaacta ttgaacatag ctaacacttt tgtaacagtt	600
agagggagca tcaggttcat tattggttc ataatgccta tgtccattgt tgccatctgc	660
tatggactca tcgctgtcaa gatccacaga agagcacttg ttaattccag ccgatccatta	720
agagtcctta cagcagttgt ggcttccttc tttatctgtt ggtttccctt tcaactgggtg	780
gcccttttag gtacaatctg gtttaaagag tcattgttta gtggctgta caaaattctt	840
gacatgtggg ttcacccaac cagctcattg gcctacttca atagttgcct caatccaatg	900
ctctatgctt tcatgggcca ggactttcat gaaagactga ttcattccct gccttccagt	960

ctggagagag ccctgagtga ggactctggc caaaccagtg atacaggcat cagttctgct 1020

ttacctcctg taaacattga tataaaagca ata 1053

<210> 6

<211> 351

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 6

Met Glu Ser Asn Tyr Ser Ile His Leu Asn Gly Ser Glu Val Val Val

5 10 15

Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Ser Met Val Val

20 25 30

Val Ser Ile Thr Phe Phe Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35 40 45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Pro His Thr Val Thr Thr Ile Trp Tyr

50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe

65 70 75 80

Leu Leu Val Glu Met Ala Met Lys Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe

85 90 95

Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Val Asn Leu Phe Gly Ser

100 105 110

Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu

115 120 125

His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys

130 135 140

Val Val Val Gly Pro Trp Ile Phe Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile

145 150 155 160

Phe Ile Phe Leu Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asp Val Tyr Cys
165 170 175
Thr Phe Asn Phe Gly Ser Trp Ala Gln Thr Asp Glu Glu Lys Leu Asn
180 185 190
Thr Ala Ile Thr Phe Val Thr Thr Arg Gly Ile Ile Arg Phe Leu Ile
195 200 205
Gly Phe Ser Met Pro Met Ser Ile Val Ala Val Cys Tyr Gly Leu Ile
210 215 220
Ala Val Lys Ile Asn Arg Arg Asn Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu
225 230 235 240
Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
245 250 255
Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Phe Lys Glu Thr Leu
260 265 270
Leu Ser Gly Ser Tyr Lys Ile Leu Asp Met Phe Val Asn Pro Thr Ser
275 280 285
Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe
290 295 300
Met Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Phe Ile His Ser Leu Pro Tyr Ser
305 310 315 320
Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Ser Ser
325 330 335
Thr Ser Ser Thr Ser Pro Pro Ala Asp Ile Glu Leu Lys Ala Pro
340 345 350

<210> 7

<211> 1053

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 7

```
atggaatcca actactccat ccatctgaat ggatcagaag tggtaggttta tgattctacc 60
atctccagag ttctgtggat cctctcaatg gtggttgtct ccatcacttt cttccttggt 120
gtgctgggca atggactagt gatitgggta gctggattcc ggatgccaca cactgtcacc 180
actatctggt atctgaatct agcattggct gacttttctt tcacagcaac tctaccattc 240
cttcttggtg aaatggctat gaaagaaaaa tggccttttg gctggttcct gtgtaaatta 300
gttcacattg tggtagatgt aaacctgttt ggaagtgtct tcttgattgc tctcattgcc 360
ttggaccgct gcatttgtgt tctgcatcca gtctgggctc agaaccacgc cactgtgagc 420
ctggctagga aggtgggttg tgggccctgg atttttgctc tgattctcac ttgcccatt 480
tttattttct tgactactgt tagaattcct ggaggagatg tgtattgtac attcaacttt 540
ggatcctggg ctcaaactga tgaagaaaag ttgaacacag ctatcacttt tgtaacaact 600
agagggatca tcaggttcct tattggtttc agcatgccca tgtcaattgt tgctgtttgc 660
tatggactca ttgctgtcaa gatcaacaga agaaaccttg ttaattccag ccgtccttta 720
cgagtcctta cagcagttgt ggcttccttc tttatctgct ggtttcctt tcagcttgtg 780
gcccttttgg gcacagtctg gtttaaagag acattgctta gtggtagtta taaaattctt 840
gacatgtttg ttaacccaac aagctcattg gcttacttca atagttgtct caatccgatg 900
ctctatgttt tcatgggcca ggactttcgt gagagattta ttcattccct gccttatagt 960
cttgagagag ccctgagtga ggattctggt caaaccagtg attcaagcac cagttctact 1020
tcacctcctg cagacattga gttaaaggcc cca 1053
```

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

aaacagtcca ccaccatgga atccaactac tccatccatc tg 42

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

ctttctagat catggggcct ttaactcaat gtc 33

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

atctgggtag ctggattccg gatg 24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

tctttcatga aagtcctggc ccatgaa 27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

aggaattcta actgtagtca tgaa 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

acagttagag ggagcatcag gttc 24

<210> 14

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

ataaagtcga ccaccatgga agccaactat tccatccctc tga 43

<210> 15

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

12/14

<223> Primer

<400> 15

aaatctagat catattgctt ttatatcaat gtttaca 37

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Human

<400> 16

Met Phe Ala Asp Arg Trp Leu Phe Ser Thr Asn His Lys

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 17

Met Thr Asn Ile Arg Lys Ser His Pro Leu Met Lys Ile Ile Asn

1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 18

Met Thr Asn Ile Arg Lys Ser His Pro Leu Met Lys Ile Ile Asn Asn

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 19

Met Thr Pro Met Arg Lys Ile Asn Pro Leu Met Lys Leu Ile Asn

1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Met Thr Pro Met Arg Lys Ile Asn Pro Leu Met Lys Leu Ile Asn His

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 21

Met Phe Val Asn Arg Trp Leu Tyr Ser Thr Asn His Lys Asp Ile

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Met Phe Ala Asp Arg Trp Leu Phe Ser Thr Asn His Lys Asp Ile

1 5 10 15

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Porcine

<400> 23

Met Thr Asn Ile Arg Lys Ser His Pro Leu Met Lys Ile Ile Asn Asn Ala Phe

1

5

10

15

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Human

<400> 24

Met Thr Pro Met Arg Lys Ile Asn Pro Leu Met Lys Leu Ile Asn His Ser Phe

1

5

10

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternat application No.
PCT/JP03/14138**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- ☒
- Claims Nos.: 58, 60

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

- 2.
- ☐
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- ☐
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The peptides as set forth in claims 1 and 6 are common to each other not in chemical structure but exclusively in being an endogenous ligand of FPRL1.

However, endogenous ligands of FPRL1 are publicly known as reported in document Int. Immunopharmacol., 2002, Vol.2, p.1, etc. Therefore, this common matter is not regarded as a special technical feature within the meaning of the second sentence in PCT Rule 13.2. There is no other common matter between the peptides as claimed in claims 1 and 6 seemingly being a special technical feature within the meaning of the second sentence in PCT Rule 13.2. (Continued to extra sheet.)

- 1.
- ☐
- As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2.
- ☐
- As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

- 3.
- ☐
- As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4.
- ☒
- No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 5, 10, 15, 17, 20, 24 and 27 and the parts depending on claims 1 to 5 in claims 12 to 14, 19, 22, 23, 26, 59 and 61.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIC SEARCH REPORT

 Internat application No.
 PCT/JP03/14138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K38/10, C07K16/18, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K38/10, C07K16/18, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Registry (STN), WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ANDERSON S. et al., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature, 1981, Vol.290, pages 457 to 465	<u>15</u> 1-5, 10, 12-14, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61
A	LE Y. et al., Formyl-peptide receptors revisited, Trends Immunol., 01 November, 2002 (01.11.02), Vol.23, pages 541 to 548	1-5, 10, 12-15, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 February, 2004 (04.02.04)Date of mailing of the international search report
17 February, 2004 (17.02.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The peptides as set forth in claims 1 and 29 are common to each other not in chemical structure but exclusively in being a peptide relating to FPRL1.

However, peptides relating to FPRL1 are publicly known as reported in document J. Biol. Chem., 1992, Vol.267, p.7637, document Int. Immunopharmacol., 2002, Vol.2, p.1, etc. Therefore, this common matter is not regarded as a special technical feature within the meaning of the second sentence in PCT Rule 13.2. There is no other common matter between the peptides as claimed in claims 1 and 29 seemingly being a special technical feature within the meaning of the second sentence in PCT Rule 13.2.

The same applies to claims 6 and 29.

Such being the case, the inventions as set forth in the present case are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus it is recognized that there are 3 groups of inventions in the present case.

国際調査

国際出願番号 PC J P 03/14138

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K7/08, A61K38/10, C07K16/18, A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K7/08, A61K38/10, C07K16/18, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Registry (STN)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ANDERSON S. et al., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, Nature, 1981, Vol. 290, p. 457-465	15 1-5, 10, 12- 14, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61
A	LE Yet al., Formyl-peptide receptors revisited, Trends Immunol., 2002 Nov 1, Vol. 23, p. 541-548	1-5, 10, 12- 15, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.02.2004

国際調査報告の発送日

17.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 58, 60 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法である。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

クレーム1、6に記載されたペプチドは共通の化学構造を有するものでなく、F P R L 1の内因性リガンドであるという点においてのみ共通する。

しかしながら、F P R L 1の内因性リガンドは、文献Int. Immunopharmacol., 2002, Vol. 2, p. 1等に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、クレーム1、6に記載されたペプチドに関する発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

(特別ページに続く)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-5、10、15、17、20、24、27及び請求の範囲12-14、19、22、23、26、59、61のうち請求の範囲1-5を引用する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄 続き

クレーム1、29に記載されたペプチドは共通の化学構造を有するものでなく、F P R L 1に関連するペプチドであるという点においてのみ共通する。

しかしながら、F P R L 1に関連するペプチドは、文献J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267, p. 7637、文献Int. Immunopharmacol., 2002, Vol. 2, p. 1等に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、クレーム1、29に記載されたペプチドに関する発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

クレーム6と29についても同様である。

よって、本願に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、3個の発明からなる発明群であると認める。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT



**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL
INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome,
Yodogawa-ku
Osaka-shi, Osaka 532-0024
Japan

Date of mailing (day/month/year) 10 February 2004 (10.02.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 3118WOOP	
International application No. PCT/JP2003/014138	International filing date (day/month/year) 06 November 2003 (06.11.2003)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 07 November 2002 (07.11.2002)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
07 Nove 2002 (07.11.2002)	2002-324189	JP	30 Dece 2003 (30.12.2003)
18 Dece 2002 (18.12.2002)	2002-367119	JP	30 Dece 2003 (30.12.2003)
05 Marc 2003 (05.03.2003)	2003-59073	JP	30 Dece 2003 (30.12.2003)
03 July 2003 (03.07.2003)	2003-191359	JP	30 Dece 2003 (30.12.2003)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 338.90.90</p>	<p>Authorized officer Patrick BLANCO (Fax 338 9090)</p> <p>Telephone No. (41-22) 338 8702</p>
---	---

PATENT COOPERATION TREATY 16

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL
INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome,
Yodogawa-ku
Osaka-shi, Osaka 532-0024
Japan

Date of mailing (day/month/year) 18 October 2004 (18.10.2004)
Applicant's or agent's file reference 3118WO0P
International application No. PCT/JP2003/014138

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 06 November 2003 (06.11.2003)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Lazar Joseph PANAKAL (Fax 338 9090)
Facsimile No. (41-22) 338.90.90	Telephone No. (41-22) 338 9634

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 3118WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/14138	国際出願日 (日.月.年) 06.11.2003	優先日 (日.月.年) 07.11.2002
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ¹ C07K7/08, A61K38/10, C07K16/18, A61K39/395		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>5</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり訂正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 11.12.2003	国際予備審査報告を作成した日 22.10.2004	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子	4 B 9548
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、出願時に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、出願時に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、出願時に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 補充欄参照

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 58, 60 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の身体の手術又は治療による処置方法である。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 補充欄参照 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ 磁気ディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-5, 10, 12-15, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-5, 10, 12-14, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61	有
	請求の範囲	15	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-5, 10, 12-15, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲15に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1(Nature, 1981, Vol. 290, p. 457-465)より進歩性を有しない。文献1には、ヒトミトコンドリアゲノムの塩基配列が記載されており、本願における配列番号22で表されるアミノ酸配列を含むシトクロームcオキシダーゼサブユニットIをコードする遺伝子も記載されている(Figure1等)。該シトクロームcオキシダーゼサブユニットIを発見して、これに対する抗体を取得することは当業者であれば容易に想到し得たものである。そしてそのような抗体には、本願における配列番号22で表されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合するものも含まれていると認められる。

請求の範囲1-5, 10, 12-14, 17, 19, 20, 22-24, 26, 27, 59, 61に係る発明は、国際調査報告で引用された文献に対して新規性及び進歩性を有する。文献1にはシトクロームcオキシダーゼとFPL1との関連が記載されておらず、しかもその点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 III 欄の続き

第III欄 1.

請求の範囲6-9, 11, 16, 18, 21, 25, 28-57, 58, 60及び請求の範囲12-14, 19, 22, 23, 26, 59, 61のうち請求の範囲1-5を引用する部分以外